



Rôle de Caveoline-1 dans la contrôle de la capacité de stockage lipidique adipocytaire

Nolwenn Briand

► To cite this version:

Nolwenn Briand. Rôle de Caveoline-1 dans la contrôle de la capacité de stockage lipidique adipocytaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2012. Français. <NNT : 2012PA066071>. <tel-00827746>

HAL Id: tel-00827746

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00827746>

Submitted on 29 May 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS VI - PIERRE ET MARIE CURIE

UFR « Biologie et sciences de la nature »

Ecole doctorale « Physiologie et Physiopathologie »

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université Paris VI

Spécialité : Physiologie et physiopathologie

Présentée par :

Nolwenn BRIAND

Sujet de la thèse :

**RÔLE DE CAVEOLINE-1 DANS LE CONTRÔLE
DE LA CAPACITE DE STOCKAGE LIPIDIQUE ADIPOCYTAIRE**

Soutenue le 2 avril 2012 devant le jury composé de :

Pr. Karine CLEMENT
Dr. Sophie GIORGETTI-PERALDI
Pr. Philippe BESNARD
Dr. Philippe LESNIK
Dr. Soazig LE LAY

Présidente
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Co-directrice de thèse

Co-directrices de de thèse : Dr. Isabelle DUGAIL et Dr. Soazig LE LAY

ABSTRACT

In a context of nutritional plethora, adipose tissue overloading may result in fat “spillover” to non-fat tissues, with subsequent lipotoxic effects. This ectopic fat accumulation has deleterious metabolic consequences, leading to the development of the metabolic syndrome associated with obesity. Thus, it seems important to understand the molecular mechanisms controlling adipose tissue storage capacities.

Caveolin-1 cooperates with the recently described cavin protein family to form membrane caveolae, flask-shaped invaginations of the plasma membrane that are particularly abundant in adipocytes and endothelial cells within adipose tissue. Caveolin-1 deficiency leads to lipodystrophy in transgenic mice models as well as human subjects, suggesting a critical role in the control of lipid storage. Studies on *Cav-1* deficient mice model (*Cav1* ^{-/-} mice) also revealed important defects in the cardiovascular function, characterized by microvascular hyperpermeability and cardiac hypertrophy. Specific reexpression of *Cav1* in endothelium (*Cav1* RC mice) allows rescuing of cardiovascular abnormalities.

To address the contribution of endothelial caveolin-1 expression to the lipodystrophic phenotype, we compared metabolic phenotypes observed in *Cav1* deficient with those of *Cav1* RC and control mice. As expected, *Cav1* ^{-/-} mice present reduced adiposity compared to control mice, phenotype still persistent after endothelial caveolin-1 reexpression. These results bring out the crucial role of adipocyte caveolin-1 expression in lipid storage mechanisms. This study also revealed an increased infiltration of non-inflammatory macrophages in caveolin-1 deficient adipose tissue compared to control. Macrophage infiltration is completely normalised in *Cav1* RC mice, underlining the implication of endothelial caveolin-1 expression in vascular permeability toward macrophages.

The persistent lipodystrophic phenotype of *Cav1* RC mice established the key role of adipocyte caveolin-1 in the control of adipose tissue lipid storage capacity. To investigate the underlying molecular mechanisms, we chose an overexpression approach of caveolin-1, cavin-1 and cavin-3 in 3T3-L1 adipocytes. All three cell lines contained a higher number of caveolae, and displayed ameliorated maximal insulin response which is known to occur in caveolae. Only caveolin-1 overexpression, but not cavin-1 or -3, leads to lipid droplet expansion both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that caveolin-1 control on lipid storage occurs outside of caveolae. In agreement, larger lipid droplets were found in cells expressing a caveolin-1-perilipin-GFP fusion construct, in which exogenous caveolin-1 strictly localized onto lipid droplets. Together our data demonstrate a specific role of lipid droplet caveolin-1 pool, independent of caveolae to modulate lipid droplet expansibility.

Keywords : lipid storage, caveolin, adipocyte, endothelium, lipid droplet

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe 8 « pathologies métaboliques et nutritionnelles : obésité, diabète » du centre de recherche des Cordeliers, dirigée par le Professeur Pascal Ferre, que je remercie chaleureusement de m'avoir accueillie dans son unité.

À mes co-directrices de thèse, les Docteurs Isabelle Dugail et Soazig Le Lay,

Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour la confiance que vous m'avez accordée en m'accueillant il y a maintenant 4 ans en Master 2, puis tout au long de ces années de thèse. Merci pour votre disponibilité et votre soutien.

Aux membres de mon jury de thèse,

Je remercie le Professeur Karine Clément de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie également le Docteur Sophie Giorgetti-Peraldi et le Professeur Philippe Besnard d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs, ainsi que Docteur Philippe Lesnik pour sa participation à ce jury de thèse.

A tous les membres du groupe « adipocyte »,

...Cécilia, ma « *little miss sunshine* », merci pour ton sourire, ta bonne humeur permanente et ton incroyable gentillesse. Merci pour tous les bons moments passés au laboratoire et en dehors. Quelle chance de travailler à tes côtés !

...Françoise et Xavier, je vous remercie de m'avoir fait partager votre expérience ; votre aide m'a été précieuse pendant ces 4 années passées au laboratoire.

... à Cédric Blouin, merci d'avoir accepté que je reprenne et que j'actualise quelques unes de tes figures de thèse...mais l'élève est loin d'avoir dépassé le maître...

Aux « jeunes » du quatrième étage,

...Berengère, ton rire résonne encore au quatrième ! Merci pour les bons moments partagés, et surtout pour ton soutien pendant les périodes difficiles.

...Nico, si on m'avait dit que ton humour de mauvais goût pourrais me manquer... Merci d'être enfin redevenu toi-même, j'espère que tu garderas (quand même) quelques bons souvenirs de ton passage au labo...N'oublies pas : « *who's the cap fit...* ».

... Julie, Yuli, Bertrand, Jean-Pierre, Rima, Rana, merci à vous tous qui contribuez à l'ambiance agréable qui règne en ces lieux.

A mes parents,

Vous m'avez toujours fait pleinement confiance et laissée libre de mes choix. La certitude de votre soutien a été une grande force pendant toutes ces années d'études. J'espère que vous considérerez que j'ai fait bon usage de la grande liberté que vous m'avez donnée.

A mon frère,

...dont je suis si fière... Merci de ton soutien et de ta présence à ma soutenance de thèse, rien n'aurait su me faire davantage plaisir.

A Louis-marie,

Merci d'être devenu mon « auxilliaire de vie » durant ces mois de rédaction et de m'avoir supportée alors que j'étais «90% odieuse » pendant ce dernier mois. Merci surtout pour cette confiance sans faille que as en moi et qui, au fil des ans, a fini par déteindre un peu : « tu as toutes les qualités... ». L'avenir nous le dira.

TABLE DES MATIERES

ABSTRACT	1
REMERCIEMENTS	5
ABBREVIATIONS PRINCIPALES	9
LISTE DES FIGURES	11
1. LE TISSU ADIPEUX, ORGANE SPECIALISE DANS LE STOCKAGE DES LIPIDES	15
1.1. COMPOSITION CELLULAIRE DU TISSU ADIPEUX	16
1.1.1. LES CELLULES DE LA FRACTION STROMA-VASCULAIRE	16
1.1.1.1. Les cellules endothéliales	16
1.1.1.2. Les cellules immunitaires	18
1.1.2. L'ADIPOCYTE, UNE CELLULE ADAPTEE AU STOCKAGE DES LIPIDES	23
1.2. LA GOUTTELETTE LIPIDIQUE, UN ORGANITE DYNAMIQUE	25
1.2.1. STRUCTURE	25
1.2.1.1. Composition lipidique	26
1.2.1.2. Protéines de structure	26
1.2.2. DYNAMIQUE DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES	29
1.2.2.1. Biogénèse des gouttelettes lipidiques	29
1.2.2.2. Accumulation de lipides neutres dans la gouttelette lipidique	30
1.2.2.3. Croissance des gouttelettes lipidiques	32
1.2.2.4. Mobilisation des réserves lipidiques : la lipolyse	37
1.2.2.5. La gouttelette lipidique, un organite qui protège des effets lipotoxiques des acides gras	40
1.2.2.6. Mort d'une gouttelette lipidique : le processus de lipophagie	42
1.2.3. INTERACTION DE LA GL AVEC LES AUTRES COMPARTIMENTS CELLULAIRES	43
1.2.3.1. Association avec les mitochondries	43
1.2.3.2. Interaction avec les cavéoles	44
2. LES CAVEOLES	47
2.1. LES PROTEINES DE STRUCTURE DES CAVEOLES	48
2.1.1. LES CAVEOLINES	48
2.1.1.1. Structure	49
2.1.1.2. Fonction des cavéolines au sein des cavéoles	50
2.1.2. LES CAVINES, NOUVELLES PROTEINES ASSOCIEES AUX CAVEOLES	51
2.1.2.1. Structure des cavines	51
2.1.2.2. Fonctions des cavines au sein des cavéoles	52

2.2. FORMATION DES CAVEOLES	55
2.3. FONCTIONS DES CAVEOLES	56
2.3.1. LES CAVEOLES CONSTITUENT DES PLATEFORMES DE SIGNALISATION	56
2.3.1.1. Ségrégation des protéines de signalisation dans les cavéoles	56
2.3.1.2. L'exemple de la NO synthase endothéliale	59
2.3.1.3. L'exemple de la signalisation insulinique	61
2.3.2. LA TRANSCYTOSE CAVEOLAIRE	62
2.3.3. CAVEOLES ET METABOLISME LIPIDIQUE	64
2.3.4. REponse AU STRESS MECANIQUE	67
<u>3. ROLE CRITIQUE DES CAVEOLES DANS LES PATHOLOGIES HUMAINES</u>	<u>71</u>
3.1. ROLES CONTROVERSEES DES PROTEINES CAVEOLAIRES DANS LES CANCERS	71
3.1.1. ROLE DE <i>CAVI</i> COMME SUPPRESSEUR DE TUMEUR	72
3.1.2. ROLE PRO-ONCOGENE DE CAVEOLINE-1	73
3.1.3. CAVINES ET CANCER	74
3.2. LES DYSTROPHIES MUSCULAIRES	76
3.2.1. LA MYOPATHIE DE DUCHENNE	76
3.2.2. LES CAVEOLINOPATHIES	77
3.3. LES LIPODYSTROPHIES	80
<u>PRESENTATION DU TRAVAIL</u>	<u>83</u>
<u>ROLES DISTINCTS DE LA CAVEOLINE-1 DANS LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES QUI COMPOSENT LE TISSU ADIPEUX</u>	<u>89</u>
BUT DU TRAVAIL	89
RESULTATS	90
DISCUSSION	91
<u>IMPLICATION DE LA CAVEOLINE-1 DANS LE CONTROLE DE LA CAPACITE DE STOCKAGE ADIPOCYTAIRE</u>	<u>99</u>
BUT DU TRAVAIL	99
RESULTATS	104
DISCUSSION	122
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	<u>131</u>
<u>ANNEXE I</u>	<u>163</u>
<u>ANNEXE II</u>	<u>165</u>

ABBREVIATIONS PRINCIPALES

ATP	adénosine triphosphate
ACSL3	<i>long-chain acyl-CoA synthetase-3</i>
ADRP	<i>adipose differentiation-related protein</i>
AGPAT	1-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransférase
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
ATGL	<i>adipose triglycéride lipase</i>
BSCL	lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip
CBD	<i>caveolin binding domain</i>
CCT	<i>CTP:phosphocholine cytidyltransferase</i>
CSD	<i>caveolin scaffolding domain</i>
DAG	diacylglycérol
DGAT	diacylglycerol acyltransferase
EC	esters de cholestérol
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxyde synthase</i>
FAT/CD36	<i>fatty acid translocase</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfert</i>
FRIL	<i>freeze-fracture immunogold labelling</i>
FSP27	<i>fat specific protein of 27 Kda</i>
G3P	glycérol-3-phosphate
GL	gouttelette lipidique
GP60	glycoprotéine de 60 Kda
GPAT	glycérol-3-phosphate acyl transférase
ICAM-1	<i>inter-cellular adhesion molecule-1</i>
IL-6	interleukine-6
RI	récepteur à l'insuline
LGMD-1C	<i>Limb-Girdle Muscle Dystrophy type 1C</i>
LHS	lipase hormono-sensible
LPA	<i>lysophosphatidic acid</i>
LPC	lysophosphatidylcholine
LPCAT	lysophosphatidylcholine acyl transférase

MG ou MAG	monoacyl glycérol
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein -1</i>
MGL	monoglycéride lipase
MMP9	<i>matrix metalloprotease 9</i>
OXPAT	protéine PAT des tissus oxydatifs
PA	<i>phosphatidic acid</i>
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAP	<i>phosphatidic acid phosphatase</i>
PC	Phosphatidylcholine
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PE	phosphatidyléthanolamine
PEMT	PE N-méthyltransférase
PI	phosphatidylinositol
PKA	protéine kinase AMPc-dépendante
PKB	Protéine kinase B
PKC	protéine kinase C
PTRF	<i>polymerase and transcript release factor</i>
Rag1	<i>Recombination activating gene 1</i>
RE	réticulum endoplasmique
RMD	<i>rippling muscle disease</i>
RSV	<i>rous sarcoma virus</i>
SDPR	<i>serum deprivation protein response</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SRBC	<i>sdr-related gene product that binds to c-kinase</i>
TA	tissu adipeux
TG	Triglycéride
TIP47	<i>tail-interacting protein of 47 KDa</i>
TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Composition cellulaire du tissu adipeux blanc
- Figure 2** : Infiltration macrophagique du tissu adipeux au cours de l'obésité
- Figure 3** : Altération de la composition cellulaire du tissu adipeux au cours de l'obésité
- Figure 4** : Structure de la gouttelette lipidique
- Figure 5** : Modèle de la biogénèse des gouttelettes lipidiques
- Figure 6** : Voie de biosynthèse des triglycérides
- Figure 7** : Mécanismes de croissance des gouttelettes lipidiques
- Figure 8** : Voies de biosynthèse et de remodelage des phospholipides
- Figure 9** : Mécanisme d'activation de la lipolyse
- Figure 10** : Morphologie des cavéoles
- Figure 11** : Structure des cavéolines
- Figure 12** : Structure des cavines
- Figure 13** : Fonctions des protéines cavines au sein des cavéoles
- Figure 14** : Modèle d'assemblage des cavéoles
- Figure 15** : Activation de la NO synthase endothéliale par le VEGF
- Figure 16** : Transcytose de l'albumine au travers de l'endothélium
- Figure 17** : Cavéoles et métabolisme lipidique
- Figure 18** : Désassemblage des cavéoles en réponse au stress mécanique
- Figure 19** : Rôles de cavéoline-1 dans la progression des cancers

- Figure 20** : Interaction de cavéoline-3 avec le complexe dystroglycane dans le muscle
- Figure 21** : Validation des lignées stables Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP
- Figure 22** : Expression des protéines cavéolaires dans les lignées stables
- Figure 23** : Augmentation de la densité des cavéoles dans les adipocytes 3T3-L1 surexprimant les protéines cavéolaires
- Figure 24** : La surexpression de cavéoline-1 induit la formation de gouttelettes lipidiques de grands diamètres
- Figure 25** : Surexpression de Cav1 RFP et Cavine-1 GFP chez la souris Nude
- Figure 26** : Mobilisation des lipides dans les lignées stables
- Figure 27** : Surexpression de cavéoline-1 spécifiquement à la gouttelette lipidique
- Figure 28** : Validation du modèle cellulaire COS7 pour la recherche de partenaires potentiels de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique 7
- Figure 29** : Co-expression de cavéoline-1 avec DGAT2 ou LPCAT3 dans les cellules COS
- Figure 30** : Processus biologiques associés aux protéines présentant des sites potentiels de liaison à cavéoline-1
- Figure 31** : Effets d'un défaut d'expression et d'une surexpression de cavéoline-1 sur le diamètre adipocytaire et mécanismes potentiellement impliqués

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1** : Phénotypes observés chez les souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1
- Tableau 2** : Expression de marqueurs de la différenciation adipocytaire dans les 3T3-L1 surexprimant Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP
- Tableau 3** : Poids des tissus adipeux endogènes et néoformés chez les souris Nude

AVANT PROPOS

La prévalence de l'obésité a considérablement augmenté ces dernières années dans tous les pays industrialisés, conduisant l'OMS à la considérer comme une épidémie qu'il faut prévenir et traiter (World Health Organization, 2011). Ainsi, 2,8 millions de personnes sont décédées du fait de leur surpoids ou de leur obésité en 2010. Cette pathologie concerne plus de 13 % des adultes en France (Charles et al., 2008)). Elle constitue un véritable enjeu de santé publique puisqu'elle accroît fortement le risque de mortalité et de morbidité lié aux complications métaboliques qui lui sont associées comme le diabète de type 2, les dyslipidémies, les complications cardiovasculaires et les cancers.

En termes cliniques, l'obésité se définit par une augmentation de la masse adipeuse dans des proportions telles que l'indice de masse corporelle ($IMC = \text{poids}/\text{taille}^2$) est supérieur à 30 kg/m². Le tissu adipeux constitue la seule réserve lipidique de l'organisme mobilisable à long terme, et occupe de ce fait une place prépondérante dans le contrôle de la balance énergétique chez les mammifères. Au cours des dernières années, de nombreuses données ont suggéré un lien entre cette accumulation ectopique de lipides et le développement des complications métaboliques (Virtue and Vidal-Puig, 2010). Ainsi, il existe des différences considérables entre les individus obèses au regard de l'accumulation lipidique dans les tissus non-adipeux : certains individus obèses morbides, c'est-à-dire dont l'indice de masse corporelle est supérieur à 40, ne présentent pas de syndrome métabolique (résistance à l'insuline, diabète, dyslipidémie, hypertension et athérosclérose) (Karelis et al., 2005). En d'autres termes, certains sujets obèses réussissent à circonscrire l'accumulation excessive de lipides au niveau de leur tissu adipeux tandis que d'autres développent des dépôts ectopiques de lipides, généralement au niveau du foie, des muscles ou du pancréas. Ces dépôts ectopiques sont à l'origine de la résistance à l'insuline *via* des phénomènes de lipotoxicité. En conséquence, le paradigme émergeant dans le contexte des maladies métaboliques met en exergue la notion de lipotoxicité sélective selon le lieu des dépôts lipidiques : l'accumulation de lipides au sein du tissu adipeux, spécialisé dans cette fonction et présentant de fortes capacités de stockage, jouerait ainsi son rôle protecteur tandis que la fuite des lipides vers d'autres tissus non-adipeux (foie, muscle et pancréas) serait préjudiciable et favoriserait le développement des complications métaboliques associées à l'obésité.

Ainsi, la capacité d'un individu à accroître sa masse adipeuse pour stocker l'excès de lipides détermine l'apparition des complications métaboliques. Dans ce contexte, il apparaît important de comprendre les mécanismes qui limitent la capacité de stockage du tissu adipeux. Nous nous sommes particulièrement intéressés à une famille de protéines, les cavéolines, ainsi qu'à des protéines qui leur sont associées, les cavines, qui semblent être impliquées dans le stockage lipidique adipocytaire.

Ce travail de thèse a pour objectif de déterminer les mécanismes moléculaires par lesquels les cavéolines et les cavines, protéines de structure des cavéoles, peuvent réguler la capacité de stockage lipidique adipocytaire. Pour introduire ce travail, nous présenterons le tissu adipeux, et plus particulièrement la gouttelette lipidique, organe spécialisé dans le stockage des lipides. Nous nous intéresserons par la suite aux structures membranaires cavéolaires, et plus particulièrement aux protéines cavéolines et cavines qui en constituent le squelette protéique, ainsi qu'à la fonction de ces invaginations membranaires. Enfin, nous soulignerons l'importance des cavéoles dans les pathologies humaines.

1. Le tissu adipeux, organe spécialisé dans le stockage des lipides

La capacité à stocker les nutriments, nécessaire pour fournir l'énergie pendant les périodes où la demande énergétique excède l'apport calorique, est une fonction vitale essentielle, déjà présente chez les organismes unicellulaires. Le stockage des lipides dans un tissu dont la fonction est entièrement dédiée à la gestion et au stockage des lipides est apparu au cours de l'évolution chez les oiseaux et les mammifères.

Les mammifères possèdent deux types de tissu adipeux (TA) : le TA blanc et le TA brun qui présentent une morphologie et des fonctions distinctes. Le premier permet le stockage de l'énergie sous forme de triglycérides (TG), tandis que le second joue un rôle dans la thermorégulation, en dissipant l'énergie sous forme de chaleur. Dans ce manuscrit, le terme tissu adipeux se réfère au tissu adipeux blanc. Outre cette fonction primaire de stockage des lipides, le TA blanc est également doté d'une fonction sécrétoire. Ainsi, la démonstration que le tissu adipeux était capable de produire de la leptine a véritablement établi la nature endocrine de l'adipocyte (pour revue, (Galic et al., 2010)). De nombreux facteurs sécrétés par le tissu adipeux (hormones, facteurs de croissance, cytokines, stéroïdes ou facteurs du complément) se révèlent importants dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'ensemble de l'organisme *via* des effets paracrines et/ou autocrine. La sécrétion de ces facteurs étant souvent dérégulée au cours de l'obésité, leur production a ainsi été associée au développement de complications métaboliques liées à l'obésité (pour revue, (Deng and Scherer, 2010)).

D'un point de vue morphologique, le tissu adipeux blanc est un organe mal délimité puisqu'il se constitue de plusieurs panicules adipeux dont la masse peut représenter entre 8 à 20 kg du poids total d'un sujet normal, et peut atteindre des proportions considérables chez un individu obèse (jusqu'à 100kg de tissu adipeux). Le tissu adipeux blanc est distribué sur l'ensemble du corps avec deux sous-types principaux, le tissu adipeux sous-cutané et le tissu adipeux viscéral, qui présentent des caractéristiques métaboliques différentes. Une accumulation de tissu adipeux sous-cutané, localisé sous la peau mais en dehors de la cavité abdominale, n'est pas associée à des désordres métaboliques. En revanche, l'accroissement du tissu adipeux viscéral, localisé dans la cavité abdominale, est considéré comme un facteur de risque important dans l'apparition du syndrome métabolique (Despres and Lemieux, 2006).

Outre les adipocytes qui composent majoritairement le tissu adipeux, d'autres types cellulaires y sont également représentés comme les préadipocytes, les cellules endothéliales, et les cellules immunitaires qui constituent la fraction stroma-vasculaire (**figure 1**).

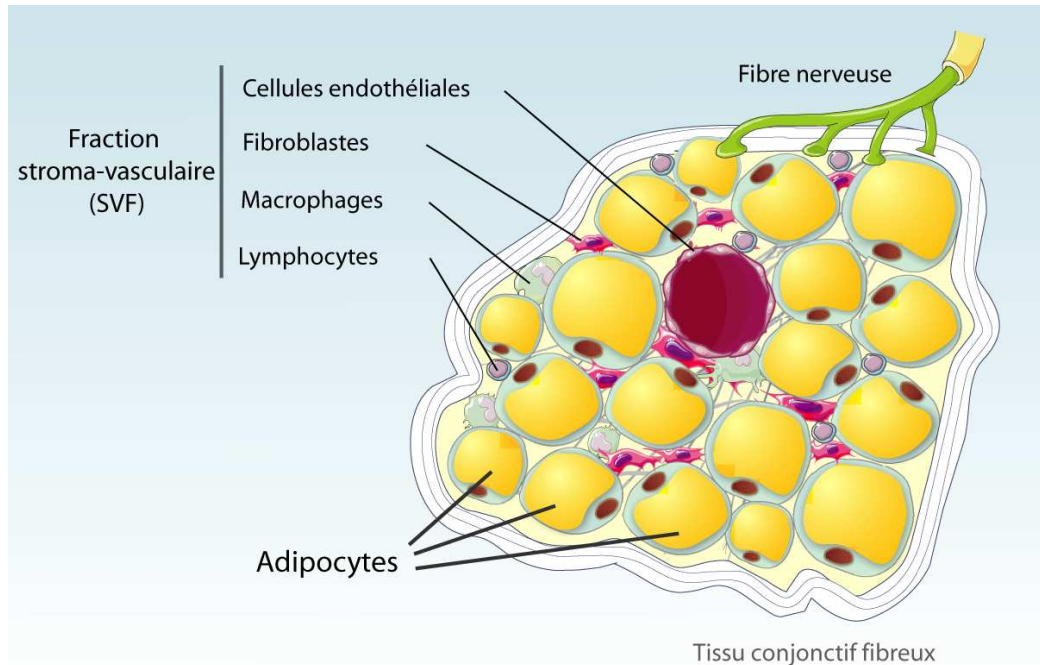


Figure 1 : Composition cellulaire du tissu adipeux blanc

Le tissu adipeux blanc est divisé en lobules entourés d'une fine paroi de tissu conjonctif fibreux. Ce tissu est composé majoritairement d'adipocytes, mais contient également des fibroblastes, des cellules endothéliales et des cellules immunitaires qui forment la fraction stroma vasculaire.

1.1. Composition cellulaire du tissu adipeux

1.1.1. Les cellules de la fraction stroma-vasculaire

1.1.1.1. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales contrôlent le passage des nutriments, des solutés et des hormones du flux sanguin vers l'espace extracellulaire. En accord avec ses fonctions de stockage et de sécrétion, le tissu adipeux présente donc un réseau capillaire dense (Bouloumie et al., 2002).

Le développement du tissu adipeux est dépendant de l'angiogénèse. En effet, le traitement de souris obèses par des agents anti-angiogéniques induit une réduction

significative de la masse adipeuse en lien avec la diminution de la vascularisation du tissu (Rupnick et al., 2002). La néovascularisation apparaît donc comme un processus crucial pour l'adipogenèse et l'expansion du tissu adipeux. En effet, les vaisseaux permettent un apport d'oxygène, de nutriments, d'hormones, de cellules immunitaires ainsi que de cellules souches dérivées de la moelle osseuse permettant un remodelage tissulaire adaptée aux conditions nutritionnelles et hormonales (pour revue, (Cao, 2007)).

L'expansion rapide de la masse adipeuse en réponse à un excès calorique peut entraîner des zones de micro-hypoxie au niveau du tissu adipeux (Hosogai et al., 2007). Cette hypoxie est un facteur important qui va stimuler la croissance et le remodelage vasculaire. En effet, ces conditions hypoxiques se traduisent par une induction de molécules pro-angiogéniques par les adipocytes (adiponectine, PAI-1, VEGF, TNF α , leptine) ainsi que de métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (telles que MMP2 et MMP-9) (Hosogai et al., 2007; Lolmede et al., 2003). Les cellules endothéliales vont pour leur part sécréter des molécules maintenant la viabilité des adipocytes (Frye et al., 2005).

Les conditions d'hypoxie liées à l'hypertrophie des adipocytes s'accompagnent d'une induction du facteur HIF-1 α (*hypoxia-inducible factor 1 α*), régulateur clé de l'expression de nombreux gènes induits en réponse à l'hypoxie. De manière surprenante, la surexpression de ce facteur de transcription spécifiquement au niveau du tissu adipeux de souris n'induit pas l'expression de facteurs pro-angiogéniques mais stimule fortement l'expression des protéines de la matrice extracellulaire (MMPs, collagènes) (Halberg et al., 2009). La fibrose du tissu adipeux qui en résulte est associée à une inflammation localisée et à une résistance à l'insuline. En conséquence, l'hypoxie du tissu adipeux pourrait être un événement clé à l'origine du dysfonctionnement de ce tissu au cours de l'obésité.

Une autre fonction essentielle des cellules endothéliales concerne le recrutement coordonné des cellules immunitaires dans les tissus. Au cours de l'inflammation, l'activation des cellules endothéliales consiste en une cascade de signalisation conduisant à la production de molécules d'adhésion cellulaires, de chémokines, et de cytokines qui activent les cellules immunitaires et les guident vers les tissus (pour revue (Cook-Mills and Deem, 2005)). L'infiltration des tissus par les leucocytes circulants est un processus comportant trois étapes : une première étape de «*rolling*» des cellules immunitaires le long de l'endothélium, suivie de leur attachement *via* des molécules d'adhésion et enfin leur transmigration au travers de l'endothélium. Chez la souris soumise au régime gras, une surexpression spécifique de la

molécule d'adhésion ICAM-1 (*inter-cellular adhesion molecule-1*) a été détectée dans le tissu adipeux, en lien avec une infiltration accrue de cellules immunitaires dans ce tissu (Brake et al., 2006).

1.1.1.2. Les cellules immunitaires

Les cellules immunitaires représentent une large proportion de la fraction stroma-vasculaire du tissu adipeux de sujets sains, leur nombre pouvant varier en fonction de la localisation du tissu (Bornstein et al., 2000). Il est maintenant clairement établi qu'au cours de l'obésité, il existe un profond remodelage tissulaire incluant un remaniement de la composition cellulaire. Plus particulièrement, l'obésité se caractérise par une infiltration macrophagique accrue qui reflète un état chronique d'inflammation de bas grade.

1.1.1.2.1. Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée, comme les neutrophiles ou les macrophages, sont impliquées dans la première réponse immunitaire non spécifique mise en jeu en présence d'un organisme pathogène. Dans le contexte de l'obésité, les macrophages sont les cellules de l'immunité innée qui ont été les plus étudiées dans le tissu adipeux. Ils sont plus abondants dans le TA viscéral que dans le TA sous cutané (Cancello et al., 2006) et leur infiltration augmente de manière proportionnelle à la quantité totale de tissu adipeux au cours de l'obésité (Curat et al., 2004; Weisberg et al., 2003).

Les macrophages constituent une population cellulaire hétérogène dont le phénotype peut varier en fonction des stimuli auxquels ils sont soumis. Dans une étude menée *in vitro*, deux états d'activation ont été décrits pour les macrophages (Lacy-Hulbert and Moore, 2006). La stimulation par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α (activation classique) va conduire à des macrophages ayant un fort potentiel inflammatoire (macrophage de type M1). En revanche, une stimulation par des cytokines telles que l'interleukine-4 ou l'interleukine-13 (activation alternative) induit la différenciation de macrophages au faible potentiel inflammatoire, jouant un rôle dans le remodelage et la réparation tissulaire (macrophage de type M2) (pour revue (Mosser, 2003)).

Chez des souris rendues obèses par régime gras, des expériences d'immunomarquage sur coupes de tissus adipeux utilisant des anticorps dirigés contre différents marqueurs de surface de macrophages M1 (CCR2+) ou M2 (CD11c+) ont révélé que les macrophages

recrutés présentent un profil plus inflammatoire que celui des macrophages résidents chez des souris non obèses se traduisant par une augmentation de la proportion de macrophages type M1 au dépend des macrophages type M2 (Lumeng et al., 2007). Des expériences complémentaires de cytométrie en flux, d'immunofluorescence et de mesure d'expression génique ont révélé que les macrophages résidents du tissu adipeux sont répartis entre les adipocytes, et expriment des gènes caractéristiques de l'état M2 (Ym1, arginase1 et IL-10) (Lumeng et al., 2008). Les macrophages M1 nouvellement infiltrés se distribuent en couronne autour des adipocytes en et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF α et MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein -1*) (**figure 2**).

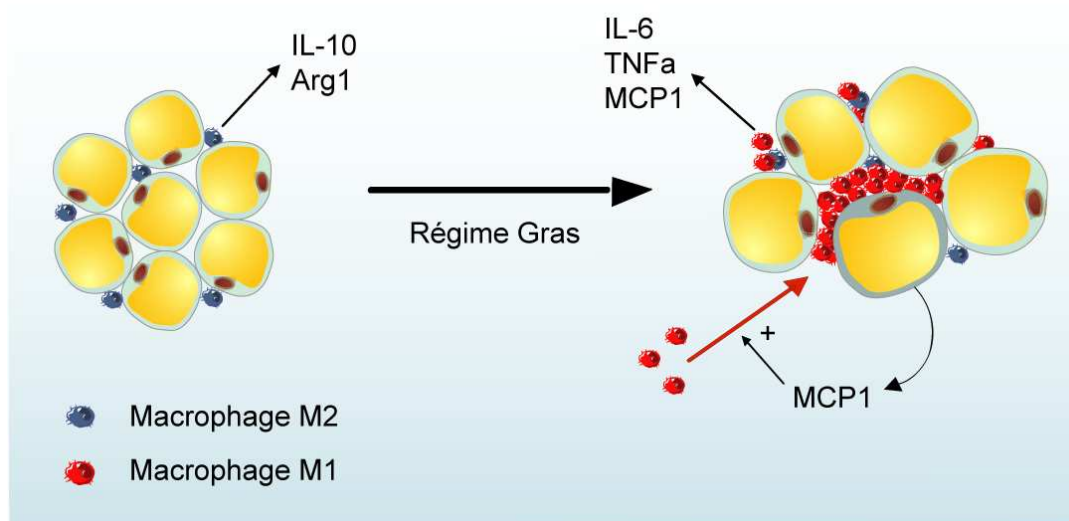


Figure 2 : Infiltration macrophagique du tissu adipeux au cours de l'obésité.

Le tissu adipeux des souris non-obèses contient des macrophages résidents de phénotype non-inflammatoire (M2). Ces macrophages expriment les gènes codant pour l'IL-10 et l'arginase-1 (Arg1). Lorsque ces animaux sont soumis à un régime gras, les adipocytes hypertrophiés sécrètent la chémokine MCP1 qui induit le recrutement des macrophages M1. Ces macrophages pro-inflammatoires sécrètent des cytokines comme l'IL-6, le TNF α et MCP1. Ils forment des structures en couronne autour des adipocytes. D'après (Lumeng et al., 2007).

Le mécanisme par lequel les macrophages sont recrutés au niveau du tissu adipeux impliquerait la sécrétion de molécules chémoattractantes par le tissu adipeux lui-même. Plus particulièrement, la molécule chémoattractante MCP-1, par liaison à son récepteur CCR2, ont été impliqués dans le recrutement de monocytes/macrophages dans plusieurs modèles d'inflammation (Charo and Taubman, 2004). CCR2 est très fortement exprimé dans les tissus adipeux d'obèses humains et de rongeurs (Bruun et al., 2005; Sartipy and Loskutoff, 2003).

De surcroît, l'expression et les concentrations circulantes de MCP-1 sont significativement augmentées dans divers modèles d'obésité de rongeurs (Kanda et al., 2006). L'analyse phénotypique des tissus adipeux de souris transgéniques déficientes pour CCR2 (Weisberg et al., 2006) ou surexprimant spécifiquement au niveau du tissu adipeux la molécule chémoattractante MCP-1 (Kanda et al., 2006) ont clairement démontré le rôle de MCP-1/CCR-2 dans le recrutement des macrophages du tissu adipeux ainsi que l'état de résistance à l'insuline en résultant.

A l'instar de ces travaux, de nombreuses études ont suggéré que le développement de la résistance à l'insuline généralement associée à l'obésité pouvait directement être relié à l'état chronique d'inflammation de bas grade observé dans les tissus adipeux d'obèses (Xu et al., 2003). L'adipocyte sécrète un certain nombre de cytokines/chémokines (TNF α , IL-6, IL-1, MCP-1 etc...) et d'adipokines (leptine, adiponectine et résistine) qui peuvent moduler la signalisation insulinaire (pour revue (Rajala and Scherer, 2003)). Au cours de l'obésité, la proportion de macrophages infiltrés dans le tissu adipeux de souris peut atteindre jusqu'à 40 % de la population cellulaire totale (Weisberg et al., 2006) contribuant ainsi significativement à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent donc directement moduler le métabolisme adipocytaire et l'état de résistance à l'insuline. Enfin, de nombreuses kinases activées lors d'une réponse inflammatoire jouent aussi un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance. En effet, l'invalidation des gènes codant les kinases PKC- θ (Protéine Kinase C- θ), IKK- α et - β (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) chez des souris entraîne une protection contre le développement d'une insulino-résistance en réponse au régime gras (Arkan et al., 2005; Hirosumi et al., 2002). Enfin, les acides gras libres pourraient directement activer le récepteur TLR4 (*Toll-like receptor 4*) - impliqué dans la réponse pro-inflammatoire par liaison du lipopolysaccharide (LPS) - au niveau des adipocytes (Shi et al., 2006). Cette étude suggère ainsi que les acides gras libres, augmentés au cours d'une surcharge nutritionnelle, pourraient directement induire une réponse immunitaire innée par liaison au récepteur TLR4, agissant comme des signaux de danger en utilisant les mêmes voies de signalisation que les pathogènes exogènes pour initier l'inflammation. De manière concordante, l'administration d'un régime gras chez des rongeurs a pour effet d'induire une endotoxémie s'accompagnant d'une augmentation de LPS au niveau du microbiote intestinal (Erridge et al., 2007). La perfusion de LPS chez des souris se traduit par une infiltration macrophagique accrue et le développement d'une résistance à l'insuline chez ces animaux (Cani et al., 2007). Ces travaux

ont ainsi révélé l'importance du microbiote intestinal dans le développement des complications liées à l'obésité.

De la même manière que chez les patients obèses, on observe également une infiltration macrophagique au niveau du tissu adipeux sous-cutané accompagnée d'une expression accrue de cytokines pro-inflammatoires chez les patients séropositifs lipodystrophiques, présentant une réduction importante de leur masse adipeuse (Johnson et al., 2004; Lagathu et al., 2007). Une étude menée dans le modèle lipoatrophique murin aP2-nSREBP1c a également révélé une infiltration massive de macrophages dans tous les dépôts adipeux, formant des dépôts en forme de couronne autour des adipocytes (Herrero et al., 2010). Cependant, les traitements anti-inflammatoires ne permettent pas corriger l'état de résistance à l'insuline chez ces animaux, suggérant que ces macrophages infiltrés ne sont pas impliqués dans la pathogénèse de la résistance à l'insuline. En effet, les macrophages infiltrés dans les tissus adipeux lipodystrophiques présentent des profils d'expression génique et des marqueurs de surface très différents de ceux présents dans les tissus adipeux obèses et jouent probablement un rôle important dans le remodelage du tissu adipeux.

1.1.1.2.2. Les cellules de l'immunité adaptative

Contrairement à l'immunité innée, le développement d'une immunité adaptative vis-à-vis d'un (ou plusieurs) antigène(s) découle de la reconnaissance de celui (ceux)-ci par des lymphocytes B ou T, dotés de récepteurs spécialisés, interaction qui entraîne leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B et T effecteurs.

La présence de lymphocytes T résidents dans la fraction stroma vasculaire des tissus adipeux inguinaux et périgénitaux a été mise en évidence en premier lieu chez la souris non-obèse (Caspar-Bauguil et al., 2005). Puis, l'accumulation de lymphocytes T associés avec des macrophages dans des structures en forme de couronne autour des adipocytes a été clairement mise en évidence dans des modèles d'obésité génétique ou induite par un régime (Wu et al., 2007). Trois études parues simultanément dans la revue *Nature Medicine* ont par la suite démontré que ces lymphocytes T sont activement régulés dans le tissu adipeux et contribuent à l'installation de l'état inflammatoire au cours de l'obésité (Feuerer et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Winer et al., 2009). Les lymphocytes Th « auxiliaires » CD4⁺ (Th pour *helper*) peuvent moduler l'activité des autres cellules immunitaires conduisant à une réponse pro-inflammatoire (Th1) *via* l'activation de la phagocytose ou à une réponse humorale (Th2) en

stimulant l'activité des lymphocytes B. Au cours de l'obésité, une augmentation du ratio lymphocytes T cytotoxiques CD8+ sur CD4+ précède l'infiltration macrophagique (Feuerer et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Winer et al., 2009). De plus, la déplétion du tissu adipeux en lymphocytes T CD8+, qu'elle soit génétique ou *via* des anticorps spécifiques, permet de réduire l'infiltration macrophagique et l'inflammation du tissu adipeux (Nishimura et al., 2009). Ces données suggèrent que les lymphocytes T CD8+ pourraient initier la cascade inflammatoire conduisant à la résistance à l'insuline du tissu adipeux. Par ailleurs, chez les souris *Rag1*(-/-), dépourvues de lymphocytes, soumises à un régime gras, un transfert de lymphocytes T CD4+ permet de normaliser l'intolérance au glucose (Winer et al., 2009). Les signaux Th2 jouent un rôle clé dans cet effet, ce qui suggère une régulation des macrophages résidents du tissu adipeux. Enfin, une diminution du nombre de lymphocytes T régulateurs CD4+ (dont la fonction principale est de réprimer l'activité des cellules de l'immunité) a été observée au cours de l'obésité (Feuerer et al., 2009; Winer et al., 2009). Des expériences de gain et de perte de fonction ont clairement démontré l'influence des lymphocytes T régulateurs sur l'état d'inflammation du tissu adipeux. Ces trois études révèlent ainsi une altération de l'équilibre entre les signaux Th1 et Th2 au cours de l'obésité conduisant à l'infiltration de macrophages de phénotype M1 et à l'inflammation du tissu adipeux (**figure 3**).

Des travaux récents ont par ailleurs révélé le rôle déterminant des lymphocytes B, impliqués dans la réponse immunitaire humorale, dans l'activation des lymphocytes T et des macrophages chez la souris obèse (Winer et al., 2011). En effet, les souris déficientes en lymphocytes B soumises à un régime gras présentent une sensibilité à l'insuline améliorée comparée à des souris contrôles, suggérant un rôle des lymphocytes B dans la résistance à l'insuline induite par l'obésité. En accord, une accumulation de lymphocytes B sécrétoires a été observée chez la souris soumise au régime gras. De plus, les lymphocytes B semblent exercer leurs effets délétères sur les paramètres métaboliques *via* les lymphocytes T. En effet, la reconstitution d'une population de lymphocytes B chez la souris *Rag1*(-/-) n'altère pas la sensibilité à l'insuline chez ces animaux. Enfin, la diminution de l'expression des marqueurs M1 dans le tissu adipeux des souris déficientes en lymphocytes B suggère l'existence d'une coopération entre les lymphocytes B et T conduisant à l'accumulation de macrophages pro-inflammatoires au cours de l'obésité (**figure 3**).

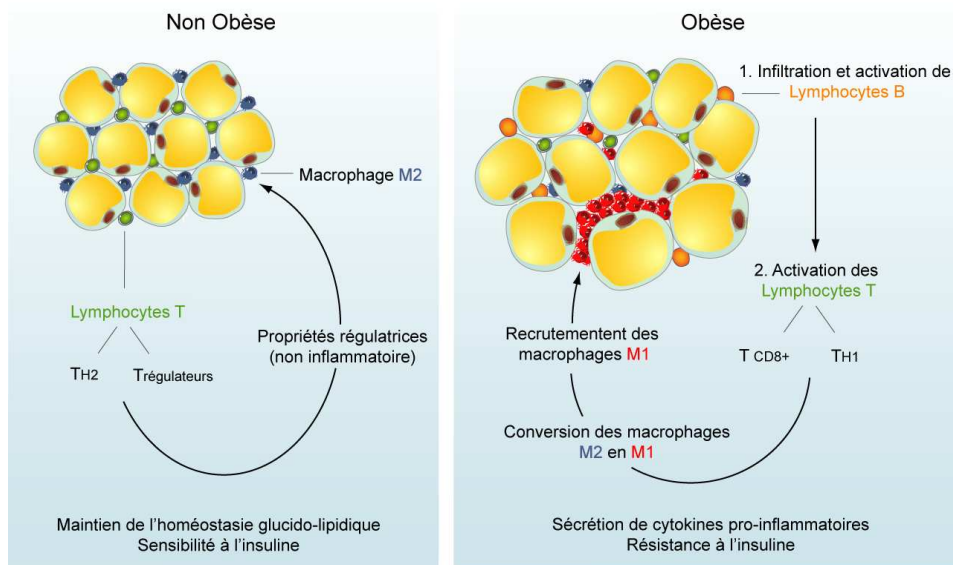


Figure 3 : Altération de la composition cellulaire du tissu adipeux au cours de l'obésité

Le tissu adipeux non obèse contient des macrophages M2 et une majorité de lymphocytes Th2 et Trégradeurs qui sécrètent des cytokines non inflammatoires et maintiennent ainsi l'homéostasie glucido-lipidique et la sensibilité à l'insuline du tissu adipeux. Au cours de l'obésité, le tissu adipeux est progressivement infiltré par des lymphocytes B qui vont activer les lymphocytes Th1 et TCD8+ devenus majoritaires au sein du tissu. Ces lymphocytes T vont stimuler d'une part la conversion des macrophages M2 en macrophages M1 pro-inflammatoires, et d'autre part le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux.

1.1.2. L'adipocyte, une cellule adaptée au stockage des lipides

L'unité cellulaire fonctionnelle du tissu adipeux est la cellule adipeuse, cellule extrêmement différenciée qui présente une plasticité et une morphologie unique.

Lorsque les apports caloriques excèdent les dépenses, le tissu adipeux va pouvoir accroître sa capacité de stockage. D'une part, l'hyperplasie du tissu adipeux permet d'augmenter le nombre d'adipocytes *via* la différenciation de préadipocytes, précurseurs déjà présents dans le tissu adipeux. D'autre part, par un mécanisme d'hypertrophie, la taille de l'adipocyte peut varier d'un facteur 10 (de 10 à 100µm) en fonction du statut nutritionnel de l'organisme. L'expansion du tissu adipeux combine donc à la fois des mécanismes d'hypertrophie et d'hyperplasie cellulaires. Il semble cependant que la mise en œuvre de ces différents mécanismes dépende de la localisation du dépôt adipeux. En effet, une étude récente menée chez l'homme montre plutôt une hypertrophie des adipocytes du TA viscéral

tandis que l'expansion du TA sous-cutané sera plutôt consécutif à des mécanismes d'hyperplasie lors d'un gain de poids consécutif à une surcharge nutritionnelle (Tchoukalova et al., 2010).

Des travaux élégamment menés par l'équipe de P. Arner ont permis d'apporter des données concrètes concernant la plasticité du tissu adipeux. Les essais nucléaires effectués par plusieurs pays dans les années 1955 à 1963 pour la mise au point de bombes nucléaires ont conduit au rejet massif d'éléments radioactifs à longue durée de vie qui ont été incorporés par les organismes vivants. Ainsi, la mesure du ^{14}C incorporé dans l'ADN génomique des adipocytes à cette période a permis d'établir que la durée de vie d'un adipocyte humain était de dix ans (Spalding et al., 2008) et que durant ce laps de temps, son contenu en triglycérides est renouvelé six fois (Arner et al., 2011). En outre, l'état d'obésité ne change ni la demi-vie des adipocytes, ni leur taux de mortalité. Ainsi, l'hypertrophie adipocytaire n'induit pas plus d'apoptose dans les adipocytes.

La taille de l'adipocyte est le reflet direct de son contenu en triglycérides : en lien avec sa fonction principale de stockage de l'énergie sous forme de lipides, l'adipocyte possède un organite spécialisé qui occupe la quasi-totalité du cytoplasme : la gouttelette lipidique (GL).

1.2. La gouttelette lipidique, un organite dynamique

Les gouttelettes lipidiques sont des organites intracellulaires de stockage, présents chez certains procaryotes et chez tous les eucaryotes (Murphy, 2001). En effet, toutes les cellules eucaryotes, de la levure aux cellules de mammifères, ont développé la capacité potentielle d'accumuler des lipides et de former des gouttelettes lipidiques en réponse à un afflux massif d'acides gras. Cependant, la composition lipidique des GLs varie en fonction du type cellulaire. Par exemple, les GLs adipocytaires sont très riches en triglycérides tandis que les cellules stellaires hépatiques et macrophages spumeux stockent respectivement des esters de rétinol et des esters de cholestérol (Brown et al., 1979; Senoo, 2004).

La GL de l'adipocyte blanc se distingue par sa structure uniloculaire, sa taille, et sa composition moléculaire. Longtemps considérées comme des agrégats inertes de lipides neutres, les GLs sont à présent vues comme des organites dynamiques, impliqués dans la maintenance de l'homéostasie lipidique cellulaire et du stockage énergétique.

1.2.1. Structure

La structure générale d'une GL consiste en un cœur de lipides neutres entouré d'une monocouche de phospholipides sur laquelle des protéines sont ancrées (**figure 4**).

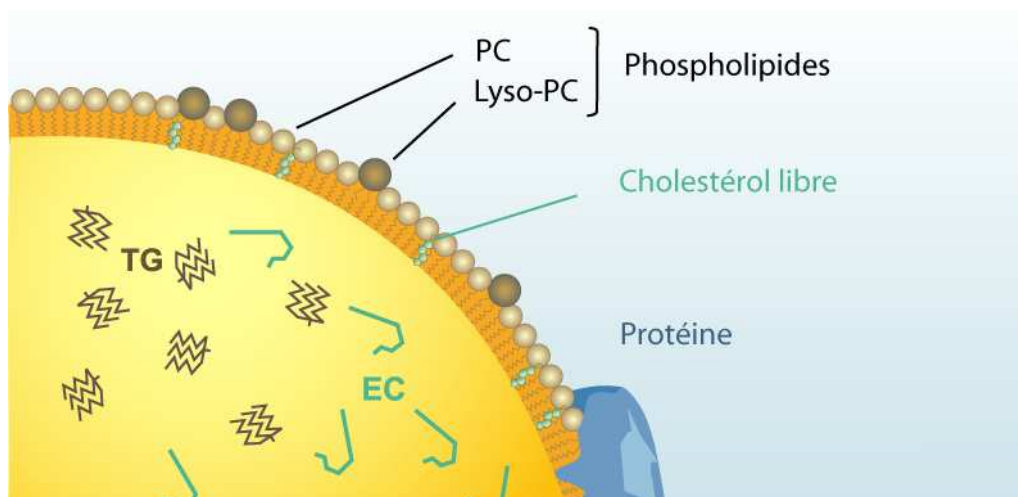


Figure 4 : Structure de la gouttelette lipidique

La gouttelette lipidique est constituée d'un cœur de lipides neutres, composé majoritairement de triglycérides (TG) et de cholestérol estérifié (EC), entouré d'une monocouche de phospholipides. De nombreuses protéines sont ancrées à la surface de la gouttelette lipidique.

1.2.1.1.Composition lipidique

Dans l'adipocyte, le cœur de la GL se compose d'une majorité de triglycérides, et de cholestérol estérifié. Récemment, l'équipe de C. Thiele a également montré que le diacylglycérol (DAG), précurseur à la fois des TG et des phospholipides, était présent en quantité non négligeable au niveau des GLs (Kuerschner et al., 2008).

Les analyses par spectrométrie de masse ont montré une composition originale de la membrane des GLs avec un enrichissement spécifique en cholestérol libre (non estérifié) et une composition phospholipidique différente de celle du réticulum endoplasmique d'où elles sont censées émaner (Blouin et al., 2010; Prattes et al., 2000; Tauchi-Sato et al., 2002). Les phospholipides qui composent la membrane des gouttelettes lipidiques sont par ordre d'abondance la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et le phosphatidylinositol (PI). Comparée aux membranes totales, la monocouche phospholipidique qui entoure la GL est particulièrement enrichie en lysoPC, lysoPE et en PC, et contient moins de sphingomyéline et d'acide phosphatidique (Bartz et al., 2007; Tauchi-Sato et al., 2002). Cette composition particulière en phospholipides joue un rôle important pour l'étanchéité de la GL. En effet, dans les adipocytes 3T3-L1, une diminution de l'expression de l'enzyme PEMT (PE N-méthyltransférase) qui convertit les PE en PC est corrélée à une augmentation de l'hydrolyse basale des TG (Horl et al., 2011). De plus, des défauts du stockage lipidiques en l'absence de cavéoline-1 ont aussi été reliés à une altération de la composition phospholipidique de la membrane de la GL, notamment une diminution relative des phosphatidylsérines (Blouin et al., 2010). Enfin, la composition phospholipidique de la surface des GLs semble aussi déterminante pour leur coalescence. En effet, des expériences de reconstitution *in vitro* de gouttelettes lipidiques contenant des lipides neutres mixés à différents ratios de phospholipides montrent que les propriétés de surfactants de certains phospholipides de surface, et particulièrement des PC, pourraient prévenir un tel processus (Krahmer et al., 2011).

1.2.1.2.Protéines de structure

1.2.1.2.1. Les protéines de la famille PAT

Les premières protéines identifiées comme étant associées aux gouttelettes lipidiques sont les membres de la famille PAT qui incluent chez les mammifères PÉrilipine, ADRP

(*adipose differentiation-related protein*), **TIP47** (*tail-interacting protein of 47 KDa*), et plus récemment S3-12 et OXPAT, la protéine PAT des tissus oxydatifs. Les protéines de la famille PAT constituent les protéines de structure majeures des GLs (Londos et al., 1999). Récemment, ces protéines ont été renommées périlipines et numérotées de 1 à 5 (Kimmel et al., 2010). ADRP/périlipine-2 et TIP47/périlipine-3 sont exprimées de manière ubiquitaire, tandis que l'expression de périlipine-1 et S3-12/périlipine-4 est restreinte aux adipocytes (Greenberg et al., 1991) et aux cellules stéroïdogéniques (Servetnick et al., 1995).

Il existe trois isoformes de la périlipine-1, périlipine-1A -1B et -1C, générés par épissage alternatif. Les séquences des périlipine-1A et -1B sont homologues pour leurs 405 premiers acides aminés et diffèrent dans leur partie C-terminale. La périlipine-1C est l'isoforme le plus court, et son expression est restreinte aux cellules stéroïdogéniques. La périlipine-1A possède de nombreux sites consensus de phosphorylation par la protéine kinase A (PKA), qui jouent un rôle majeur dans le mécanisme de la lipolyse. La périlipine-1 est spécifiquement et très fortement exprimée dans les adipocytes et est reconnue comme étant une protéine régulatrice majeure du métabolisme lipidique adipocytaire. En effet, l'absence de périlipine-1 impacte sévèrement la fonction de mobilisation des lipides en augmentant la libération des acides gras dans des conditions basales non stimulées (Tansey et al., 2001). Inversement, l'expression ectopique de cette protéine dans des fibroblastes a pour conséquence une augmentation significative du contenu en triglycérides intracellulaire due à la diminution de la capacité de mobilisation des lipides dans ces cellules (Brasaemle et al., 2000). Ainsi, la périlipine-1 jouerait un rôle de bouclier protéique vis-à-vis de l'action de dégradation des lipases cytoplasmiques. De manière intéressante, dans les adipocytes isolés à partir du tissu adipeux des souris invalidées pour la périlipine-1, la périlipine-2 devient la protéine majoritaire du manteau des GLs (Tansey et al., 2001). La comparaison de GLs entourées uniquement de périlipine-1 ou -2 montre que la périlipine-2 ne peut se substituer totalement à la périlipine-1 qui seule joue un rôle protecteur contre la lipolyse. Cette différence revêt une importance particulière si on considère les effets lipotoxiques des dépôts ectopiques de lipides dans les tissus non-adipeux. De plus, le rôle de la périlipine-1 ne se limite à celui de bouclier protéique puisqu'elle agit également comme une protéine d'ancrage coordonnant l'accès des lipases cytoplasmiques à la gouttelette lipidique (cf. § 1.2.2.4.2).

ADRP/Périlipine-2 est induite au cours de la différenciation adipocytaire, pour être finalement remplacée par périlipine-1 dans les adipocytes matures (Brasaemle et al., 1997).

En accord, ni la différenciation adipocytaire ni la lipolyse ne sont altérées chez les souris déficientes pour ADRP/Périlipine 2 (Chang et al., 2006).

TIP47/périlipine-3 et S3-12/périlipine-4 ont la particularité d'être cytosoliques lorsque le contenu en lipides des cellules est stable. L'ajout d'acides gras à longues chaînes, qui induit la formation de nouvelles GLs, va induire leur translocation à la surface des GLs naissantes. En effet, dans les adipocytes, TIP47/Périlipine-3 et S3-12/Périlipine-4 sont localisées à la surface des GLs de petite taille, tandis que la périlipine-1 entoure les GLs de grand diamètre (Wolins et al., 2005).

1.2.1.2.2. FSP27 détermine la structure uniloculaire des gouttelettes lipidiques

La protéine FSP27 (*fat specific protein of 27 KDa*) a été découverte lors d'une étude visant à identifier des gènes induits au cours de la différenciation adipocytaire (Danesch et al., 1992). FSP27 est associée aux GLs dans les adipocytes blancs ainsi que dans les foies stéatosés des souris Ob/Ob (Brasaemle et al., 2004; Matsusue et al., 2008; Puri et al., 2007). Des homologies partielles de séquence (20% à 40%) avec la périlipine-1, correspondant à des régions de 20 à 30 acides aminés, ont été détectées sur le gène de FSP27, établissant FSP27 comme une *bona fide* protéine de la GL (Puri et al., 2008). De plus, le niveau d'expression de FSP27 est corrélé à la taille des GLs. En effet, sa surexpression augmente le diamètre des GLs et la quantité de TG stockée dans les adipocytes 3T3-L1, très probablement du fait d'une diminution de l'oxydation des acides gras (Puri et al., 2007). A l'inverse, les adipocytes des souris déficientes pour FSP27 présentent des GLs multiloculaires (Nishino et al., 2008). En effet, une étude récente a démontré l'implication de FSP27 dans un mécanisme de transfert des lipides conduisant à la formation de GLs de grande taille (Gong et al., 2011) (cf. § 1.2.2.3.3). La fragmentation des GLs qui a pour conséquence une augmentation de l'interface lipidique avec le cytoplasme favoriserait l'accès des lipases à leurs substrats. En accord avec cette hypothèse, les souris déficientes pour FSP27 présentent une lipolyse accrue en réponse à une stimulation β -adrénergique avec pour conséquence des animaux transgéniques plus minces que leurs contrôles (Nishino et al., 2008). Enfin, chez l'homme, une mutation sur le gène codant pour FSP27 a été associée à un syndrome de lipodystrophie (Rubio-Cabezas et al., 2009). Ces données démontrent le rôle majeur de FSP27 pour la formation ou le maintien de la structure uniloculaire de la GL, caractéristique des adipocytes blancs.

1.2.2. Dynamique des gouttelettes lipidiques

1.2.2.1. Biogénèse des gouttelettes lipidiques

Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer le processus de formation des gouttelettes lipidiques (Murphy and Vance, 1999; Ploegh, 2007; Waltermann et al., 2005; Zweytick et al., 2000), mais aucune donnée expérimentale ne permet de favoriser l'un ou l'autre de ces modèles.

Selon le modèle le plus largement admis, la GL se formerait au niveau du réticulum endoplasmique (RE) suite à une accumulation de lipides neutres entre les deux feuillets membranaires. Cette accumulation conduirait au bourgeonnement de la GL, le feuillet cytoplasmique de la membrane du RE formant la membrane de la nouvelle GL (Murphy and Vance, 1999). Dans une variation de ce même modèle, la GL ne serait jamais totalement isolée, mais resterait en continuité avec le RE (Goodman, 2008) (**figure 5**). Cependant, le fait que des protéines transmembranaires (telles que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 1) ou des protéines du RE dont le domaine N-terminal est normalement intraluminal (comme la calnexine ou BiP) se retrouvent à la surface des GLs a conduit l'équipe de H. Ploegh à proposer un modèle alternatif. Selon ce dernier, les GLs pourraient se former à partir des deux feuillets du RE par excision d'une bicelle (Ploegh, 2007). La membrane du RE serait alors pour partie entourée du feuillet interne du RE, et pour autre partie du feuillet externe, son excision laissant alors un pore transitoire au niveau de la membrane du RE (**figure 5**).

L'idée que les GLs soient générées au niveau du RE est appuyée par le fait que les enzymes de la voie de synthèse des TG peuvent être localisées à la surface de cet organe (Buhman et al., 2001). Ces deux modèles permettent également d'expliquer qu'un certain nombre de protéines se retrouvent à la fois au niveau du RE et à la surface de la GL (Brown, 2001).

Cependant, les résultats de lipidomique montrent que la nature des phospholipides de la monocouche de la GL diffère de celle de la membrane du RE (Tauchi-Sato et al., 2002). Cette différence pourrait s'expliquer par un remodelage des phospholipides durant la formation des GL. Notamment, au début de la différenciation adipocytaire, le ratio PC/PE des cellules décroît de manière concomitante avec la formation des GL (Horl et al., 2011). Cet enrichissement en PE, phospholipides coniques, pourrait être nécessaire pour l'induction de la

courbure de la membrane et le bourgeonnement de la GL. Par la suite, ces PE vont être convertis en PC *via* la PEMT.

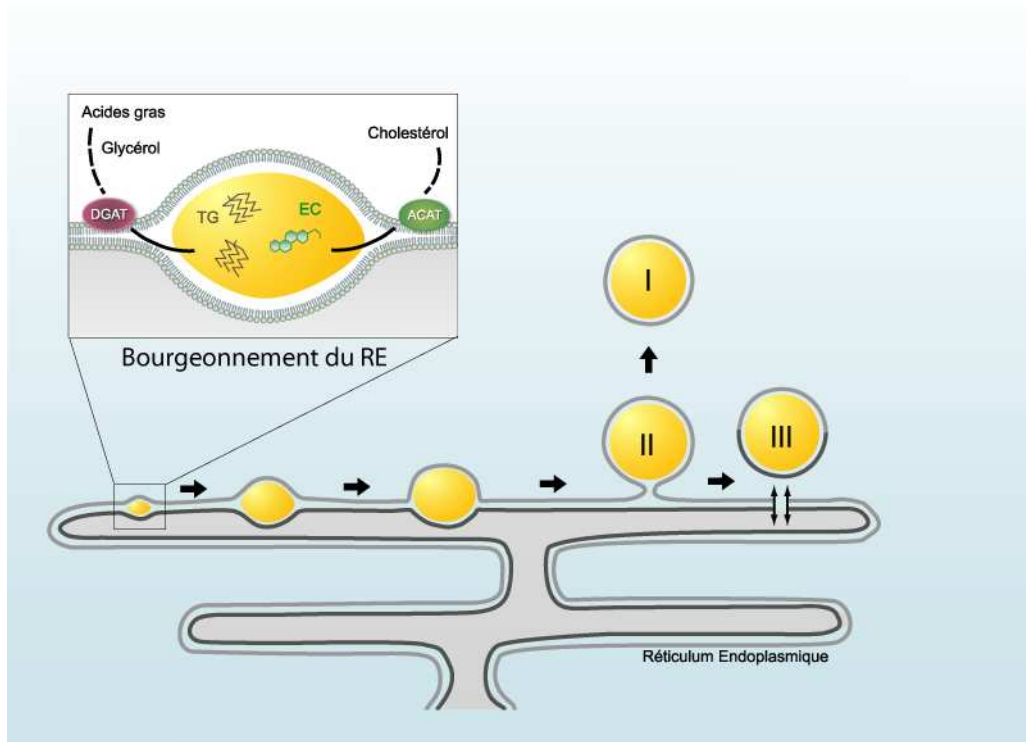


Figure 5 : Modèles de la biogénèse des gouttelettes lipidiques (GL)

Selon l'hypothèse classiquement admise, l'accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) induit le bourgeonnement du feuillet cytoplasmique et conduit à la formation d'une GL individualisée (I). Dans une variation de ce même modèle, la GL resterait associée au RE (II). Alternativement, la GL pourrait être formée par le bourgeonnement des deux feuillettes du RE, leur excision laissant un pore transitoire dans la membrane du RE (III).

1.2.2.2. Accumulation de lipides neutres dans la gouttelette lipidique

Les acides gras stockés dans les gouttelettes lipidiques proviennent généralement de sources exogènes dans la plupart des types cellulaires, excepté dans le foie et le tissu adipeux des rongeurs qui possèdent une capacité remarquable de lipogenèse *de novo* à partir de précurseurs glucidiques. Ainsi, l'extraction d'acides gras du compartiment sanguin, où ils sont associés aux lipoprotéines, constitue la principale source de lipides utilisés soit pour les besoins cellulaires soit pour le stockage (pour revue (Havel, 1997)). L'entrée des acides gras libres, faisant suite à l'hydrolyse par la lipoprotéine lipase des lipoprotéines riches en triglycérides au niveau de l'endothélium, constitue une étape critique pour leur utilisation ultérieure par certains types cellulaires tels que les myocytes ou les adipocytes. Les acides

gras sont ensuite transportés à travers la membrane plasmique de l'adipocyte via des transporteurs membranaires tels que FAT/CD36, puis intracellulaires comme aP2/FABP (Frohnert and Bernlohr, 2000). De manière alternative, certains acides gras peuvent provenir de l'endocytose de lipoprotéines telles les lipoprotéines de faible densité (ou LDL) dans les cellules qui expriment le récepteur LDL (Anderson et al., 1977). Les processus contrôlant la disponibilité des acides gras sont étroitement régulés par les conditions nutritionnelles et hormonales.

Les acides gras intracellulaires ont besoin d'être activés (ajout d'un groupement coenzyme A) pour une utilisation ultérieure par la cellule. Leur stockage potentiel sous forme de triglycérides fait suite à l'estérification de trois acides gras sur une molécule de glycérol (**figure 6**). Les acides gras destinés à l'oxydation sont dirigés directement après leur activation vers cette voie métabolique. A l'inverse, les acides gras qui seront stockés ou utilisés pour la synthèse de phospholipides membranaires suivent une voie métabolique commune qui diverge tardivement au niveau de la synthèse de diacylglycérols : soit une nouvelle estérification les conduira vers leur stockage sous forme de triglycérides, soit ils seront orientés vers la voie de synthèse des phospholipides. Ainsi, le stockage de l'énergie et la synthèse de phospholipides sont des voies métaboliques étroitement liées.

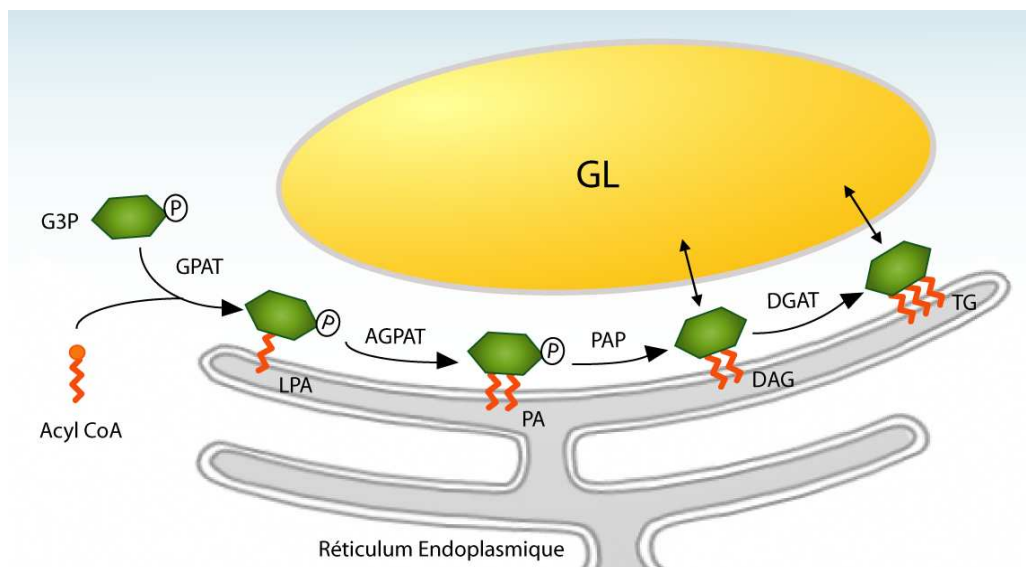


Figure 6 : Voie de biosynthèse des Triglycérides

L'acide lysophosphatidique (LPA) est synthétisé par la glycérol-3-phosphate acyltransférase (GPAT) à partir de glycérol-3-phosphate (G3P) et d'un acide gras activé, c'est-à-dire lié au Coenzyme A (CoA). Le LPA est à nouveau estérifié par l'acylglycérophosphate acyltransférase (AGPAT) pour former l'acide phosphatidique (PA). Le PA est ensuite déphosphorylé en diacylglycérol (DAG). La diacylglycérol acyltransférase (DGAT), localisée au niveau du RE ou de la GL, va catalyser la dernière étape de synthèse des triglycérides (TG).

1.2.2.3. Croissance des gouttelettes lipidiques

A l'état postprandial, l'élévation des taux plasmatiques d'insuline va favoriser le stockage lipidique au niveau du tissu adipeux, d'une part en inhibant la lipolyse (Elks and Manganiello, 1985; Eriksson et al., 1995) et d'autre part en favorisant l'entrée des acides gras dans l'adipocyte (Ong et al., 1988; Picard et al., 1999). Dans l'adipocyte, les acides gras sont estérifiés sous forme de triglycérides pour être stockés dans la gouttelette lipidique qui doit donc adapter sa taille au statut nutritionnel de l'organisme.

Différents mécanismes peuvent rendre compte de l'accroissement des gouttelettes lipidiques dans des conditions où le stockage lipidique est stimulé. Dans le modèle décrit précédemment où la GL reste en contact avec le RE, les lipides néosynthétisés peuvent diffuser librement vers la GL. Cependant, si la GL est détachée du RE, un transport des lipides vers la GL doit être envisagé. En l'absence de protéines décrites pour le transport cytosolique des lipides neutres, quatre mécanismes peuvent expliquer la croissance des GLs : la fusion des GLs dépendante des protéines SNAREs, la synthèse des triglycérides *in situ* directement à la surface de la GL, le transfert des lipides neutres impliquant la protéine FSP27, et la coalescence des gouttelettes lipidiques (**figure 7**).

1.2.2.3.1. Mécanisme de fusion dépendant des SNAREs

Les mécanismes de fusion vésiculaires sont bien caractérisés et font appel au système des SNAREs (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*) : la liaison d'un v-SNARE (pour *vesicular*) et d'un t-SNARE (pour *target*) forme un complexe induisant une déformation membranaire et la fusion des vésicules (pour revue (Chaineau et al., 2009)).

Des expériences de microscopie confocale en temps réel dans des adipocytes 3T3-L1 ont révélé l'existence d'un processus de fusion des GLs dépendant des microtubules (Bostrom et al., 2005). Par la suite, le même groupe a révélé la présence des SNAREs SNAP-23, syntaxine5 et VAMP4 à la surface des GLs (Bostrom et al., 2007). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que ces protéines pouvaient s'associer en complexe. La mise sous silence de chacune de ces protéines à l'aide de petits ARNs interférents a pour conséquence une diminution de la taille des GLs, suggérant un rôle fonctionnel de ce complexe dans la fusion des GLs. Toutefois, cette méthodologie ne permet pas d'exclure que ces observations soient la conséquence d'une perturbation globale du trafic vésiculaire dans

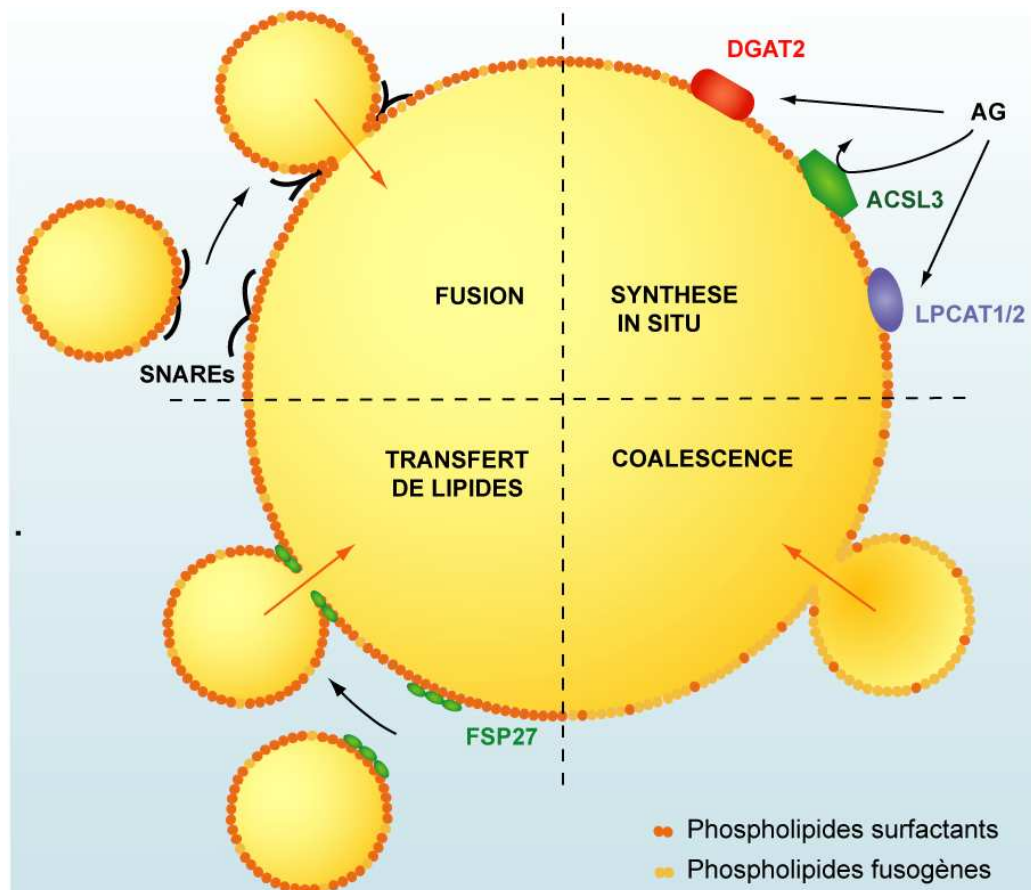


Figure 7 : Mécanismes de la croissance des gouttelettes lipidiques

La fusion des GLs par des processus dépendants des protéines SNAREs est un processus peu fréquent. La croissance *in situ* des GLs nécessite la présence de la DGAT2 (diacylglycérolacyltransférase 2) synthétisant les TG à leur surface. Des enzymes activant les acides gras comme l'ACSL3 (*long chain acyl CoA synthetase 3*) ou remodelant les phospholipides comme les lysophosphatidylcholine acyltransférase 1 et 2 sont également présentes à la surface de ces organites. Une modification de la composition phospholipidique de la GL, conduisant à un enrichissement des phospholipides à faible pouvoir surfactant peut conduire la coalescence des GLs et donc à la formation de GLs de grande taille. Enfin, il a récemment été démontré que la protéine FSP27 permet la formation de points de contact entre les GLs et donc un transfert de lipides neutres vers la GL de plus grande taille.

les cellules. Des études ultérieures de microscopie *in vivo* ont par ailleurs montré que ce mécanisme de fusion est peu fréquent (Kuerschner et al., 2008; Wolins et al., 2005). D'autre part, des expériences de microscopie électronique quantitative menée sur des fibroblastes ont montré que l'incorporation des TG dans des GL préexistantes n'était pas modifiée après une dépolarisation des microtubules (Cheng et al., 2009). Ces mécanismes de fusion dépendant des SNAREs ne semblent donc pas primordiaux dans la croissance des gouttelettes lipidiques.

1.2.2.3.2. Synthèse des triglycérides à la surface des gouttelettes lipidiques

La synthèse locale de lipides neutres au niveau de la GL apparaît comme un mécanisme simple et direct pour la croissance des GL.

Grâce à l'utilisation d'un lipide fluorescent dans le modèle adipocytaire 3T3-L1, l'équipe de C. Thiele a pu mettre en évidence une synthèse de TG directement à surface des GLs (Kuerschner et al., 2008). En effet, lors d'un apport en acide oléique, cette équipe montre la translocation de la DGAT2 (diacylglycerol acyltransferase-2) du RE vers la GL, et la synthèse de TG à partir de DAG stockés au niveau de cet organite. De plus, la fraction de DGAT2 associée aux GLs a une activité enzymatique beaucoup plus importante que celle localisée au niveau du RE. Ces résultats sont confortés par une publication récente qui montre que dans les cellules COS7, un mutant DGAT2 présent uniquement au niveau des GLs, mais non présent au niveau du RE, permet la synthèse des TG (McFie et al., 2011).

La synthèse de TG à partir de DAG requiert des acides gras activés, c'est à dire liés au coenzyme A (CoA), qui sont synthétisés par la famille des acyl-CoA synthétases. Plusieurs isoformes d'ACSL (*long-chain acyl-CoA synthetase-3*) ont été détectés à la surface des GLs dans les adipocytes 3T3-L1 (Brasaemle et al., 2004). Par ailleurs, l'ACSL3 est également présente sur les GLs dans une lignée d'hépatocytes humains (Huh7) (Fujimoto et al., 2004), et une activité acyl-CoA synthétase a pu être détectée sur des GLs isolées à partir de ces cellules, appuyant l'hypothèse d'une synthèse des TG *in situ* à la GL (Fujimoto et al., 2007). Cependant, le fait que le stock de TG cellulaire diminue lorsque l'ACSL3 est inhibée suggère également un rôle dans la recapture des acides gras libérés par la lipolyse basale. En accord, dans les adipocytes 3T3-L1 l'ACSL3 est présente à la surface des GLs uniquement dans des conditions de lipolyse stimulée (Brasaemle et al., 2004).

Enfin, la croissance de la GL *via* une synthèse des TG *in situ* nécessite un couplage avec une synthèse de la membrane phospholipidique. La phosphatidylcholine (PC), phospholipide majoritaire de la GL, peut être synthétisée *via* 3 voies : le *Kennedy pathway* permet une synthèse *de novo*, le *Lands pathway* permet un remodelage de la composition en acide gras des PC, et enfin la voie impliquant l'enzyme PEMT convertit les PE en PC (**figure 8**). Dans les cellules *Drosophila Schneider 2* (S2), les enzymes clés de la synthèse *de novo* de la phosphatidylcholine sont localisées à la GL (Guo et al., 2008). Dans ce même modèle, les auteurs ont récemment démontré la translocation de la CCT (pour *CTP:phosphocholine cytidyltransferase*), enzyme limitant pour la synthèse des phospholipides, à la surface des

GLs en croissance qui en conséquence augmente de 8 fois l'activité de l'enzyme (Krahmer et al., 2011). Le recrutement de CCT à la GL et son activation en réponse à une charge d'acide oléique ont aussi été confirmés dans plusieurs lignées cellulaires murines. Par ailleurs, deux enzymes du remodelage des phospholipides, LPCAT-1 et -2 (lysophosphatidylcholine acyltransférase) sont aussi présentes à la surface des GLs où elles catalysent la synthèse de PC à partir de LPC (Moessinger et al., 2011).

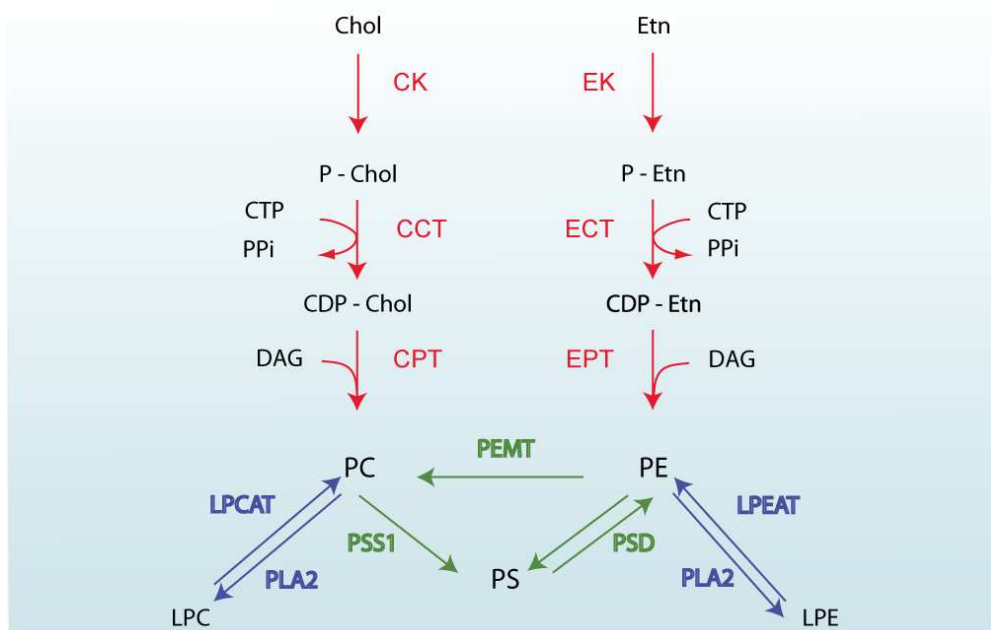


Figure 8 : Voies de biosynthèse et de remodelage des phospholipides

Chez les mammifères, le *Kennedy pathway* (rouge) permet la synthèse *de novo* de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE) à partir de choline (Chol), d'éthanolamine (Etn), et de diacylglycérol (DAG). Ces phospholipides peuvent être remodelés au niveau de leurs têtes polaires via la voie d'interconversion des phospholipides (vert), ou au niveau de leurs acides gras via le *Land's pathway* (bleu). P-Chol, phosphocholine; CDP-Chol, cytidine diP-Chol; P-Etn, phosphoéthanolamine; CDP-Etn, cytidine diP-Etn; PS, phosphatidylsérine; LPC, lysoPC; LPE, lysoPE; CK, Chol kinase; CCT, Chol cytidylyltransférase; CPT, Chol phosphotransférase; EK, Etn kinase; ECT, Etn cytidylyltransférase; EPT, Etn phosphotransférase; PSS1, PS synthase 1; PSD, PS décarboxylase; PEMT, PE méthyltransférase; CCT, CTP: P-Chol cytidyltransferase; PLA2, phospholipase A2; LPCAT, LPC acyltransferase; LPEAT, LPE acyltransferase.

1.2.2.3.3. Croissance par transfert de lipides neutres

Récemment, deux études ont mis en évidence l'implication de la protéine FSP27 dans un mécanisme de transfert de lipides entre une ou plusieurs gouttelettes lipidiques (Gong et al., 2011; Jambunathan et al., 2011). La première étude a révélé que la protéine FSP27 se concentre au niveau de sites de contacts entre deux GLs (Gong et al., 2011). De plus, des

expériences de photoblanchiment de gouttelettes lipidiques ont révélé un échange rapide de lipides neutres des gouttelettes de petite taille vers les plus grosses gouttelettes dépendant de la présence de FSP27. Cette étude suggère que le transfert de lipides s'effectuerait via la formation d'un pore entre deux ou plusieurs gouttelettes lipidiques. Dans une étude parue peu après, il a été démontré que ce processus de transfert de lipides est précédé d'un regroupement des GLs (Jambunathan et al., 2011). Des expériences de microscopie confocale menées dans des cellules COS7 transfectées avec différentes portions de la protéine FSP27 ont permis d'identifier les différents domaines protéiques impliqués dans chacune de ces deux étapes.

1.2.2.3.4. Coalescence des gouttelettes lipidiques

D'un point de vue physique, la coalescence est un phénomène par lequel deux substances identiques dispersées dans un milieu liquide se réunissent afin de minimiser la surface de contact avec le milieu.

Ce mécanisme énergétiquement peu coûteux pourrait être mis en jeu lors de la croissance des gouttelettes lipidiques. En effet, plusieurs publications parues récemment ont mis en évidence un lien entre la composition phospholipidique et la taille des gouttelettes lipidiques (Fei et al., 2011; Horl et al., 2011; Krahmer et al., 2011). En particulier, une analyse génomique à large spectre chez la levure a permis l'identification de plusieurs mutants présentant des gouttelettes de très grande taille (Fei et al., 2011). Pour une majorité, les gènes mutés sont impliqués dans le métabolisme des phosphatidylcholines (PC). En effet, les PC sont des phospholipides possédant un important pouvoir surfactant (Krahmer et al., 2011). De ce fait, la diminution de la proportion de PC au profit des phosphatidyléthanolamines (PE) et de l'acide phosphatidique (PA), phospholipides fusogènes, favorise les processus de coalescence et la formation de GL de grandes tailles (Krahmer et al., 2011). Ainsi, les gouttelettes lipidiques émanant du RE, compartiment membranaire plus riche en PA que les GLs, pourraient coalescer avec les gouttelettes lipidiques préexistantes et ainsi accroître leur volume.

1.2.2.4. Mobilisation des réserves lipidiques : la lipolyse

La lipolyse est la réaction biochimique qui induit le catabolisme des triglycérides stockés dans la GL en acides gras et glycérol. Ce mécanisme est mis en jeu durant les périodes de jeûne ou d'exercice physique pour fournir de l'énergie aux tissus comme le foie, le muscle squelettique, les reins et le cœur. Le mécanisme d'activation de la lipolyse le mieux décrit est la voie dépendante de l'Adénosine MonoPhosphate cyclique (AMPc). Cette voie est initiée par la liaison des catécholamines aux récepteurs β -adrénergiques. Ces récepteurs sont couplés à une protéine G stimulatrice qui va activer l'adénylate cyclase, enzyme membranaire catalysant la synthèse d'AMPc. L'augmentation de la concentration cellulaire en AMPc qui en résulte va permettre l'activation de la protéine kinase AMPc dépendante (PKA), qui régule plusieurs acteurs de la cascade lipolytique (**figure 9**).

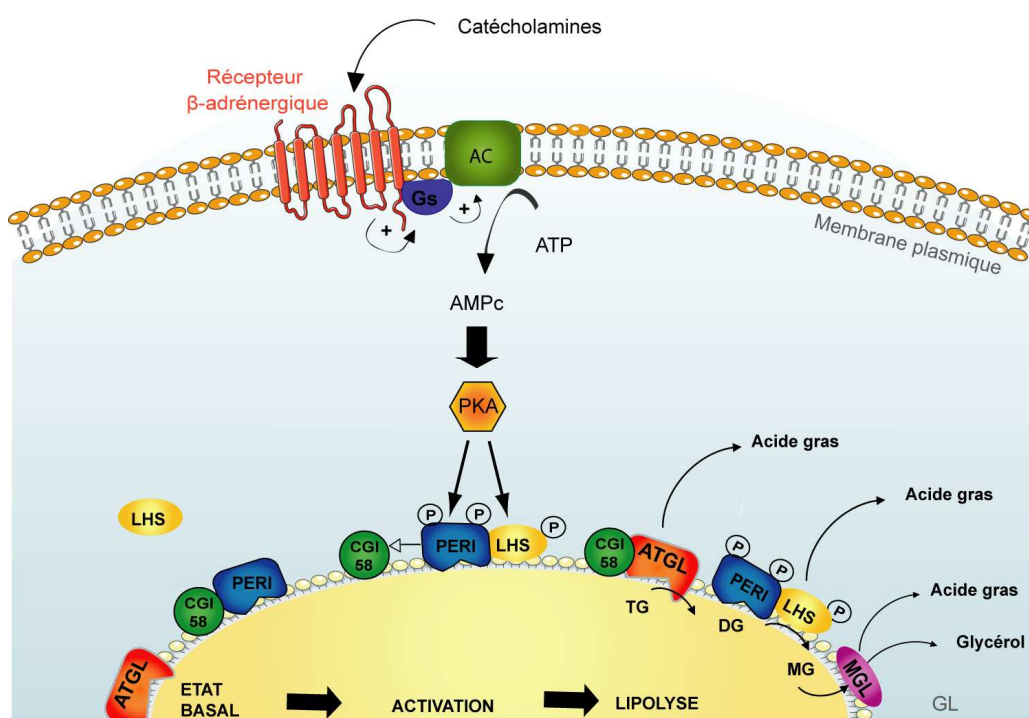


Figure 9 : Mécanisme d'activation de la lipolyse

Les catécholamines se lient aux récepteurs β -adrénergiques couplés à une protéine G stimulatrice (Gs) qui active l'adénylate cyclase (AC), enzyme convertissant l'ATP en AMPc. L'élévation de la concentration intracellulaire en AMPc active la protéine kinase AMPc-dépendante (PKA). La PKA va phosphoryler la périlipine-1 (PERI) et la lipase hormono-sensible (LHS) qui vont alors interagir. D'autre part, la périlipine-1 phosphorylée va relarguer la protéine *comparative gene identification 58* (CGI58), cofacteur de l'*adipose triglyceride lipase* (ATGL). Sur la GL, la liaison de CGI58 à l'ATGL va activer cette dernière et permettre la première étape d'hydrolyse des triglycérides (TG) en diglycérides (DG). Ces DG vont ensuite être hydrolysés en monoglycérides (MG) puis en acides gras et glycérol par les actions consécutives de la LHS et de la monoglycéride lipase (MGL).

1.2.2.4.1. Les lipases

La lipolyse repose sur des hydrolases spécifiques communément appelées lipases. Actuellement, trois enzymes ont été impliquées dans l'hydrolyse complète des TG : l'ATGL (pour «*adipose triglycéride lipase*»), la LHS (lipase hormono-sensible), et la MGL (monoglycéride lipase).

- L'ATGL induit la dégradation sélective des TG

Découverte en 2004 par 3 groupes de manière indépendante (Jenkins et al., 2004; Villena et al., 2004; Zimmermann et al., 2004), cette enzyme catalyse de manière spécifique la première étape de l'hydrolyse des TG en DAG et acides gras. En effet, son activité d'hydrolyse des DAG est 10 fois moins élevée que pour les TAG, et presque nulle pour les autres substrats lipidiques (Zimmermann et al., 2004). Cette enzyme est ubiquitaire mais exprimée très fortement dans le TA blanc et brun.

L'activité de l'ATGL est augmentée de manière significative par l'interaction avec une protéine activatrice appelée CGI58 (*comparative gene identification 58*) (Lass et al., 2006). La stimulation maximale est obtenue avec des concentrations équimolaires de l'enzyme et de son co-activateur. L'activité de l'ATGL est donc régulée par la disponibilité de CGI58.

Le phénotype des souris déficientes pour l'ATGL souligne le rôle majeur de cette enzyme dans la lipolyse adipocytaire (Haemmerle et al., 2006). La masse adipeuse de ces souris transgéniques est significativement augmentée, et leur taux d'acides gras libres plasmatique est réduit. Ce phénotype s'explique par une diminution de 80% de l'activité d'hydrolyse des TG mesurée dans les adipocytes *in vitro*. De plus, ces souris ne parviennent pas à maintenir leur température corporelle à jeun, et sont particulièrement sensibles au froid. En l'absence d'ATGL, les TA blancs et bruns ne sont donc pas en mesure de mobiliser suffisamment d'acide gras pour maintenir l'homéostasie énergétique de l'organisme.

- La lipase hormono-sensible

La lipase hormono-sensible (LHS) est induite par le jeune et son activité, stimulée par les hormones cataboliques, a été découverte dans le TA blanc au début des années 60 (HOLLENBERG et al., 1961). Elle est capable d'hydrolyser de nombreux substrats comme les TG, les DAG, MAG (monoacyl glycérol), les esters de cholestérol ainsi que les esters de rétinol. Cependant, ces données mesurées *in vitro* montrent que la LHS a une activité

hydrolase 10 fois plus importante pour les DAG que pour les TG (Fredrikson et al., 1981; Yeaman et al., 1994). Sa distribution tissulaire est similaire à celle de l'ATGL, avec l'expression la plus forte détectée dans les TA blancs et bruns. L'activité de la LHS est régulée directement par la PKA (Stralfors and Belfrage, 1983). Cette phosphorylation augmente d'environ 2 fois son activité.

De manière inattendue, les souris déficientes pour la LHS ne sont pas obèses (Osuga et al., 2000). Au contraire, leur masse de TA est réduite et elles sont résistantes à l'obésité induite par un régime gras (Harada et al., 2003). C'est d'ailleurs ce trait phénotypique qui a démontré que la LHS ne pouvait catalyser l'étape de dégradation des TG en DAG, et à conduit à la recherche d'autres lipases et à la découverte de l'ATGL. Ce phénotype adipeux s'explique par différents mécanismes, notamment une synthèse réduite des TG et une nécrose des adipocytes. Cependant, l'accumulation de DAG dans le TA de ces souris a permis de confirmer le rôle limitant de la LHS pour l'hydrolyse des DAG *in vivo* (Haemmerle et al., 2002).

- La monoglycéride lipase

La monoglycéride lipase (MGL) a été isolée pour la première fois à partir de TA de rat (Tornqvist and Belfrage, 1976). Son activité spécifique pour les MAG est constitutivement élevée dans les adipocytes. Actuellement, aucune donnée n'indique que l'expression ou l'activité de la MGL soit régulée hormonalement ou par le statut énergétique de la cellule.

Récemment, l'équipe de R. Zechner a généré une souris déficiente pour la MGL (Taschler et al., 2011). Comme attendu, ces souris présentent une diminution de l'activité d'hydrolase des MAG, et une augmentation concomitante des MAG dans le tissu adipeux. Cette diminution de l'hydrolyse des MAG est partiellement compensée par la LSH. Cependant, les taux plasmatiques de glycérol et d'acides gras sont réduits chez ces souris, indiquant un défaut de lipolyse.

1.2.2.4.2. Rôles de la périlipine-1 dans la régulation de la lipolyse

En l'absence de stimulation hormonale, la périlipine-1 joue un rôle protecteur à la GL en limitant l'accès des lipases (cf. §. 1.2.1.2.1). De plus, elle lie CGI58 empêchant ainsi la co-activation de l'ATGL (Yamaguchi et al., 2004). De ce fait, la lipolyse basale est augmentée

dans le TA blanc des souris déficientes pour la périlipine-1, et ces animaux sont plus minces que leurs contrôles sauvages (Martinez-Botas et al., 2000; Sztalryd et al., 2003).

En réponse à une stimulation β -adrénergique, la périlipine-1 est phosphorylée sur 6 résidus sérine par la PKA (Miyoshi et al., 2007). La LHS va alors pouvoir lier la périlipine-1 phosphorylée et ainsi accéder à la GL. La phosphorylation de la LHS par la PKA et sa translocation à la GL augmentent son activité de 100 fois dans le TA blanc (Lass et al., 2006). La périlipine-1 ainsi phosphorylée libère CGI58, le co-activateur de l'ATGL (Granneman et al., 2007; Granneman et al., 2009; Subramanian et al., 2004) (**figure 9**). La périlipine phosphorylée permet donc l'ancrage des lipases à la GL, et de ce fait constitue une protéine régulatrice majeure dans le processus de lipolyse stimulée.

1.2.2.5. La gouttelette lipidique, un organe qui protège des effets lipotoxiques des acides gras

Les acides gras sont des substrats essentiels pour la production d'énergie et la synthèse des lipides membranaires et des molécules de signalisation lipidique. Cependant, de part leurs propriétés détergentes, les acides gras libres peuvent exercer des effets délétères en perturbant l'intégrité des membranes biologiques, en modifiant l'homéostasie cellulaire ou encore induisant la production de dérivés lipidiques. L'altération de ces différents paramètres cellulaires peut ainsi se traduire par une induction du stress du réticulum endoplasmique et de l'inflammation, des dysfonctionnements mitochondriaux ou encore la mort cellulaire (pour revue (Shulman, 2000)). Collectivement, ces effets délétères sont regroupés sous le terme de lipotoxicité (Unger et al., 2010).

Les acides gras peuvent exercer leurs effets directement par un « effet ligand » (par exemple en se liant aux récepteurs nucléaires PPAR), mais aussi *via* l'action des différents intermédiaires de la voie de biosynthèse des triglycérides (MAG, DAG) ou encore de manière plus globale *via* les différents dérivés lipidiques associant les acides gras (glycérophospholipides, sphingolipides, hormones, vitamines...). Ainsi, les effets lipotoxiques observés suite à une surcharge lipidique résultent d'effets pléiotropiques complexes plus ou moins bien étudiés. De nombreuses études se sont ainsi concentrées sur les effets lipotoxiques des DAG et des céramides, reconnus comme très actifs pour réguler négativement la voie de signalisation insuline (pour revue (Holland and Summers, 2008)).

Parmi les mécanismes moléculaires évoqués, plusieurs études rapportent que les effets délétères des DAG passeraient par une activation des PKC (Protéine Kinase C) qui, en phosphorylant les protéines IRSs (*Insulin Receptor Substrate*), inhiberaient la propagation du signal insuline (Samuel et al., 2010). Cependant, compte tenu des effets métaboliques distincts des différents isomères de DAG et de leur localisation dans divers compartiments cellulaires, ces mécanismes moléculaires restent très discutés (pour revue (Zechner et al., 2012)). Les céramides, pour leur part exerceraient leurs effets négatifs sur la voie de l'insuline *via* l'inhibition de la PKB (Protéine Kinase B) suite à l'activation de la PKC atypique PKC ζ (Powell Mol cell Biol 2003). Il est toutefois important de noter que les effets lipotoxiques des acides gras en général ne se limitent pas à la formation de ces deux intermédiaires. Notamment, l'accumulation de dérivés d'acides gras conduit également à l'accumulation d'oxyde nitrique (NO) et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) aux effets cytotoxiques.

Le stockage des acides gras au sein d'un organite spécialisé comme la gouttelette lipidique revêt donc un caractère fondamental au vu des effets délétères que peuvent induire les acides gras libres. Leur liaison à des protéines chaperonnes telles que celles de la famille des FABPs est ainsi utilisé pour limiter les effets lipotoxiques des acides gras. Ainsi, la double invalidation chez la souris des gènes codant deux protéines FABPs exprimées dans l'adipocyte, *aP2* et *mal1*, conduit à une résistance à l'obésité associée à des altérations du transport lipidique cellulaire et systémique démontrant le rôle de ces protéines chaperonnes dans l'homéostasie des acides gras (Maeda et al., 2005). Cependant, ce processus de liaison des acides gras peut difficilement être régulé et permet essentiellement d'exercer un rôle tampon au niveau cellulaire. A l'inverse, l'estérification des acides gras au glycérol, permettant leur stockage sous forme de triglycérides inertes, est ainsi utilisée par les cellules pour détoxifier les acides gras libres par un équilibre métabolique. Cette adaptation cellulaire visant à limiter les effets toxiques des acides gras non-estérifiés repose sur une régulation précise de la balance stockage (estérification des acides gras) *vs* lipolyse (hydrolyse des TG) permettant à la fois de pourvoir aux besoins énergétiques de l'organisme en limitant l'augmentation des concentration d'acides gras non estérifiés. Ceci est corroboré par les modèles animaux où les fonctions de stockage ou de lipolyse sont altérées. Ainsi, les souris *Atgl* (-/-), qui stockent de grandes quantités de TG dans le muscle squelettique et le foie, sont plus sensibles à l'insuline que leurs contrôles (Haemmerle et al., 2006). Parallèlement, une lipolyse basale diminuée, comme c'est le cas chez les souris transgéniques surexprimant la périlipine-1 au niveau du tissu adipeux, améliore la sensibilité à l'insuline sous régime gras

(Miyoshi et al., 2010). De ce point de vue, la périlipine-1, dont l'expression est essentiellement adipocytaire, joue un rôle crucial notamment en régulant l'accès des lipases cytoplasmique à la GL, limitant ainsi la fuite des acides gras dans des conditions basales (cf. § 1.2.2.4). Les autres membres de la famille périlipine, qui forment le manteau des GLs non adipocytaires, ne peuvent pas se substituer totalement à la périlipine-1 dans cette fonction, et les adipocytes déficients pour la périlipine-1 présentent de ce fait une lipolyse basale élevée (Tansey et al., 2001). De manière surprenante, la périlipine-1, pourtant décrite comme spécifique de l'adipocyte, est exprimée *de novo* dans les hépatocytes humains stéatosés (Straub et al., 2008), ce qui pourrait constituer un mécanisme de défense ayant pour but le maintien des lipides sous forme de TG inertes dans la GL. De même, il a été récemment démontré que la périlipine-1 est exprimée dans les îlots de Langerhans chez le rat, la souris et l'homme (Borg et al., 2009). De plus, dans la lignée de cellule beta INS-1 exposée au palmitate, une surexpression de périlipine-1 induit une augmentation de l'accumulation de TG et une diminution de la lipolyse, permettant le maintien de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Le stockage des acides gras sous forme de triglycérides au sein d'une gouttelette lipidique entourée d'un manteau protéique limitant l'accès des lipases cytoplasmique constitue donc une protection efficace contre les effets lipotoxiques des acides gras libre.

1.2.2.6. Mort d'une gouttelette lipidique : le processus de lipophagie

Sans remettre en question l'importance des lipases cytoplasmiques dans la mobilisation des stocks lipidiques, un autre processus de dégradation de la gouttelette lipidique a été récemment décrit et appelé lipophagie (Singh et al., 2009). Il est bien connu que l'autophagie est un mécanisme clé dans le recyclage des organites cellulaires endommagés qui sont séquestrés dans des autophagosomes puis dégradés après fusion avec des lysosomes. La lipophagie utilise la machinerie autophagique pour dégrader la GL, les lipides étant ainsi hydrolysés par les lipases lysosomales. Ce processus de lipophagie a initialement été mis en évidence chez des souris transgéniques où des gènes clés du processus autophagique (*atg5* ou *atg7*) avaient spécifiquement été invalidés dans le foie : ces études ont permis de démontrer l'importance de la lipophagie dans le métabolisme lipidique d'hépatocytes dans des conditions de jeûne, dans lesquelles l'activité des lipases cytoplasmiques est réduite (Singh et al., 2009). Des approches similaires d'invalidation spécifique des gènes *atg* dans le tissu adipeux n'ont pas permis, en revanche, de mettre en évidence de lipophagie active dans les adipocytes : en effet, l'inhibition du processus

d'autophagie interfère avec la différenciation adipocytaire (Baerga et al., 2009). Etant donné que l'invalidation simultanée des deux principales lipases cytoplasmiques adipocytaires (HSL et ATGL) diminue l'activité lipolytique de 90%, il est peu probable que l'autophagie joue un rôle primordial dans la mobilisation des lipides dans l'adipocyte (Schweiger et al., 2006). Cependant, on ne peut exclure que ce processus puisse se substituer à une lipolyse déficiente. En effet, nous avons montré une autophagie active dans des adipocytes isolés de souris invalidées pour le gène de la cavéoline-1, animaux incapables de mobiliser leurs lipides en réponse à une stimulation adrénergique (Le Lay et al., 2010). Qui plus est, l'autophagie peut aussi être activée dans des macrophages chargés d'esters de cholestérol et contribue ainsi au processus d'efflux de cholestérol (Ouimet et al., 2011). Ainsi, de plus en plus de données laissent à penser que la mobilisation des lipides par autophagie pourrait jouer un rôle physiologique important dans plusieurs types cellulaires, nécessitant la caractérisation plus avant de ce mécanisme.

1.2.3. Interaction de la GL avec les autres compartiments cellulaires

Plusieurs études protéomiques réalisées à partir de gouttelettes lipidiques adipocytaires purifiées (Brasaemle et al., 2004) ou isolées à partir d'autres types cellulaires (pour revue (Zehmer et al., 2009)) ont permis la mise en évidence d'un panel de protéines bien plus large qu'attendu qui constitue le protéome de la GL. Outre les protéines de la famille périlipine, ces études ont révélé la grande diversité des protéines associées aux GLs qui ne s'apparentent pas uniquement au métabolisme lipidique. Ainsi, des molécules de signalisation (PKC, cavéolines, Ras), des protéines impliquées dans le trafic membranaire (Arf, Rab, protéines Rho), des protéines constitutives du cytosquelette (actine, filamine A, chaîne lourde de la myosine) ainsi que des chaperonnes ont été identifiées dans les différentes analyses. Ces observations ont contribué à mettre en exergue l'aspect dynamique des GLs et suggèrent une communication active de ces organites avec les autres compartiments cellulaires.

1.2.3.1. Association avec les mitochondries

Le lien fonctionnel entre GL et mitochondrie apparaît évident, dans la mesure où la mitochondrie utilise les acides gras issus de la lipolyse pour générer de l'ATP par β -oxydation. La grande proximité entre les GLs et les mitochondries a été bien documentée, et très souvent confirmée par des images de microscopie électronique montrant des

mitochondries tout autour de la GL (Himms-Hagen et al., 2000; Mottillo et al., 2007). De plus, cette proximité entre les GLs et les mitochondries est accrue durant la lipolyse.

Dans les cellules cardiaques, cette association repose sur la périlipine-5 (dont l'expression est restreinte aux tissus oxydatifs) qui peut recruter la mitochondrie à la surface des GLs lorsque la lipolyse est activée. Le domaine de 20 acides aminés responsable de cette interaction n'est pas présent sur les autres périlipines (Wang et al., 2011a). Il est donc peu probable que les périlipines exprimées dans l'adipocyte soient impliquées dans le même mécanisme.

1.2.3.2. Interaction avec les cavéoles

La membrane plasmique d'un adipocyte est couverte par de petites invaginations membranaires de 50 à 100 nm de diamètre appelées cavéoles, dont le manteau est formé par les protéines cavéolines. L'association des cavéolines avec les GLs a été démontrée aussi bien *in vitro* (Fujimoto et al., 2001; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001) qu'*in vivo* (Fernandez et al., 2006), et apparaît comme un phénomène régulé. En effet, dans les adipocytes 3T3-L1, notre groupe a montré que l'ajout de lipides (cholestérol ou acide oléique) induit la translocation de cavéoline-1 à la GL par un mécanisme s'apparentant à de l'endocytose cavéolaire (Le Lay et al., 2006). De plus, le fait que les cavéolines s'associent aux GLs au cours de la différenciation adipocytaire et se situent préférentiellement sur les GLs de grande taille (Blouin et al., 2008) suggère une fonction des cavéolines dans la croissance des GLs.

Récemment, des expériences de FRIL (*Freeze-fracture immunogold labelling*) ont confirmé la présence des cavéolines non seulement à la surface de la GL mais également dans le cœur de lipides neutres (Robenek et al., 2011). Déjà observée en 2002 par le groupe de T. Fujimoto (Tauchi-Sato et al., 2002), la présence de cette protéine amphiphile dans un environnement hydrophobe questionne, et ce résultat demande à être confirmé par d'autres méthodes.

Bien que les GLs soient des organites potentiellement présents dans tous les types cellulaires, la GL de l'adipocyte apparaît comme hautement spécialisée, tant par sa morphologie que par les protéines spécifiques qui lui sont associées. La GL adipocytaire présente une structure uniloculaire unique, et occupe près de 95% du cytoplasme. La protéine FSP27, fortement exprimée dans les adipocytes, détermine la morphologie uniloculaire de la GL adipocytaire. Une autre protéine spécifique, la périlipine-1, joue un rôle majeur dans la

régulation fine de la lipolyse. A l'état basal, elle constitue une barrière protectrice pour la GL, et va activement participer au recrutement des lipases lorsque la lipolyse est activée. Enfin, la cavéoline-1, protéine de structure des cavéoles, peut s'associer de manière réversible aux GLs au cours de la différenciation adipocytaire, ou en réponse à une charge d'acides gras. La présence de cavéoline-1 à la surface des GLs de grande taille suggère une fonction dans la croissance des GLs, mais le mécanisme impliqué reste à élucider.

2. Les cavéoles

Les cavéoles constituent un sous-type de radeaux lipidiques (communément appelés rafts), domaines membranaires particulièrement riches en cholestérol et en sphingolipides qui capables de ségréger un certains nombre de molécules de signalisation (Simons and Ikonen, 1997). Cette composition lipidique particulière leur confère une résistance aux détergents et cette propriété est utilisée pour isoler les microdomaines lipidiques résistants aux détergents (ou DRMs pour *Detergent Resistant Membranes*) des membranes totales. Les cavéoles ont été pour la première fois mises en évidence par Palade en 1953 (Palade, 1953), et définies comme des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre. En réalité, les cavéoles peuvent également être rassemblées en rosettes ou avoir une forme tubulaire (**figure 10**). Ces domaines lipidiques membranaires sont présents dans la plupart des types cellulaires mais sont particulièrement abondants dans les cellules musculaires, les cellules endothéliales et les adipocytes dans lesquels ils représentent jusqu'à 30% de la surface cellulaire (Razani et al., 2002c).

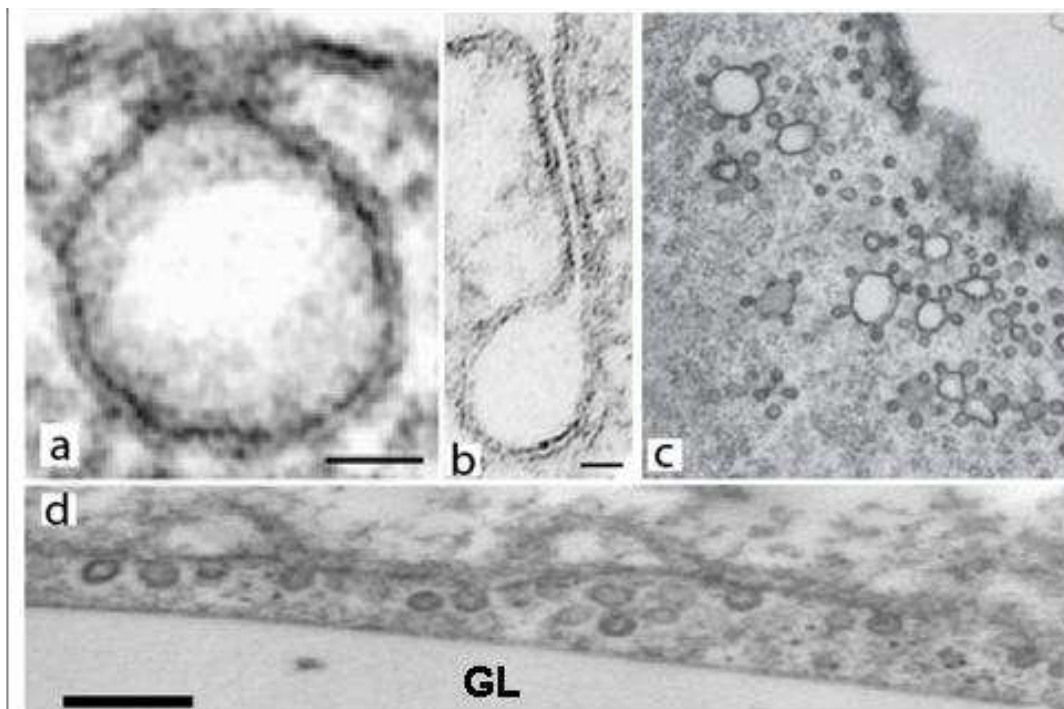


Figure 10 : Morphologie des cavéoles

Les cavéoles sont classiquement décrites comme des structures membranaires en forme d'oméga (a). Cependant, elles peuvent également adopter une forme tubulaire (b) ou être assemblées en rosettes (c). Dans les adipocytes, les cavéoles sont particulièrement abondantes et très proches de la gouttelette lipidique (d). Echelles: (a) et (b) 20nm ; (c) 30nm. D'après (Predescu et al., 2003) (a) et (b) ; (Parton and Simons, 2007) (c).

Dans les années 1990, l'identification des cavéolines, une famille de protéines nécessaires pour la formation des cavéoles, a permis d'avancer dans la compréhension du rôle de ces structures (Kurzchalia et al., 1992; Rothberg et al., 1992). Plus récemment, de nouvelles protéines partenaires des cavéolines ont été découvertes et rassemblées sous le nom de cavines. Leur interaction avec les cavéolines apparaît importante pour la formation et la fonction des cavéoles.

2.1. Les protéines de structure des cavéoles

2.1.1. Les cavéolines

A la membrane plasmique, les cavéolines forment des oligomères de haut poids moléculaire qui constituent le manteau des cavéoles. Il existe 3 isoformes de cavéolines différemment exprimés selon les types cellulaires.

Cavéoline-1 est une protéine de 178 acides aminés présente dans la plupart des types cellulaires, et très fortement exprimée dans les cellules endothéliales, les adipocytes, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses (Scherer et al., 1994). Deux isoformes, cavéoline-1 α et cavéoline-1 β , sont générés par épissage alternatif, cavéoline-1 α étant l'isoforme majoritaire.

Cavéoline-2 présente le même profil d'expression que cavéoline-1, avec laquelle elle interagit pour former des hétéro-oligomères (Scherer et al., 1996). L'expression de cavéoline-2 seule ne permet pas d'induire la formation de cavéoles. De plus, en l'absence de cavéoline-1, cavéoline-2 est retenue dans l'appareil de Golgi puis dégradée *via* le protéasome (Mora et al., 1999; Parolini et al., 1999; Razani et al., 2001).

Cavéoline-3 est l'isoforme spécifique des cellules musculaires. Sa structure et sa fonction sont comparables à celles de cavéoline-1. Cavéoline-3 a la capacité de former des cavéoles, et n'est dépendante de cavéoline-1 ni pour son transport à la membrane ni pour la formation d'oligomères (Li et al., 1998).

2.1.1.1. Structure

Les cavéolines présentent une structure en épingle à cheveux avec les extrémités N- et C-terminales cytosoliques, et un domaine membranaire qui est inséré entre les feuillets des membranes plasmiques ou de l'appareil de Golgi. Cavéoline-1 possède un domaine *scaffolding* (CSD) d'environ 20 acides aminés (82-101) qui permet son interaction avec les autres cavéolines mais aussi avec de nombreuses autres protéines telles que des kinases de la famille src (Sargiacomo et al., 1993), des protéines G (Lisanti et al., 1994) ou eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) (Garcia-Cardena et al., 1996a). Toutefois, certains auteurs considèrent que le CSD des cavéolines pourrait être inséré dans la membrane plasmique (Arbuzova et al., 2000). En effet, une partie du CSD contient également un site consensus pour la reconnaissance et la fixation du cholestérol (94-101), et le peptide correspondant à ce domaine est inséré dans la membrane plasmique (Epand et al., 2005). Les résidus 101-126 sont amphiphiles et par conséquent intégrés dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique. A l'extrémité C-terminale, trois résidus cystéine sont palmitoylés. Ces palmytoylations ne sont pas nécessaires pour l'insertion dans la membrane, mais jouent un rôle de stabilisation (Dietzen et al., 1995) (**figure 11**).

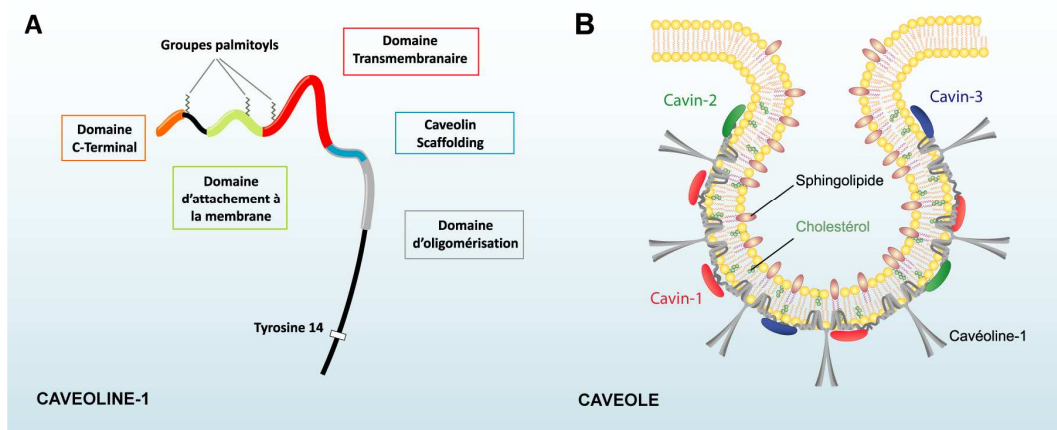


Figure 11 : Structure des cavéolines et des cavéoles

A. La cavéoline-1 présente une structure en épingle à cheveux avec les extrémités N- et C-terminales cytoplasmiques. Elle possède différents domaines permettant son insertion dans la membrane plasmique, son interaction avec d'autres protéines et son oligomérisation. B. Les cavéoles constituent un sous-type de radeau lipidique, domaines membranaires enrichis en cholestérol et en sphingolipides. Les oligomères de cavéolines, associés aux protéines cavins, forment le manteau des cavéoles.

Cavéoline-1 peut-être phosphorylée sur Tyr14 par les familles de tyrosine kinases Src ou Abl (Lee et al., 2000; Sanguinetti and Mastick, 2003). Cette phosphorylation a lieu en réponse à des facteurs de croissance, des stimulations hormonales ou encore un stress oxydatif et joue un rôle majeur dans les processus d'endocytose (cf. § 2.3.2). Une autre phosphorylation, moins bien caractérisée peut avoir lieu sur la Ser80. La mutation de cette serine en alanine augmente la capacité de cavéoline-1 à lier le cholestérol (Fielding et al., 2004). En revanche, une mutation phospho-mimétique de cette sérine en acide glutamique provoque la rétention de cavéoline-1 dans l'appareil de golgi (Kirkham et al., 2008; Schlegel et al., 2001). Cette phosphorylation sur sérine pourrait ainsi jouer un rôle important pour le transport des cavéolines de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique.

2.1.1.2. Fonction des cavéolines au sein des cavéoles

L'expression des protéines cavéolines est déterminante dans la formation des cavéoles. En effet, les cellules n'exprimant pas cavéoline-1 sont dépourvues de cavéoles (Drab et al., 2001) et l'expression de cavéoline-1 *de novo* dans des cellules suffit à induire leur formation (Fra et al., 1995). Cependant, la surexpression de cavéoline-1 dans cellules endothéliales n'a pas d'effet sur le nombre de cavéoles (Bauer et al., 2005), suggérant l'existence d'autres facteurs limitant récemment identifiés et nommés cavines (cf § 2.1.2). Cavéoline-2 en revanche ne semble pas requise pour la formation des cavéoles (Razani et al., 2002b), même si la co-expression de cavéoline-1 et cavéoline-2 conduit à la formation de cavéoles plus uniformes (Li et al., 1998), plus profondes (Fujimoto et al., 2000), et plus abondantes (Lahtinen et al., 2003) comparée à l'expression de cavéoline-1 seule.

Les cavéolines jouent probablement un rôle en dehors des cavéoles. En effet, les cavéolines sont localisées dans différents pools intracellulaires, au niveau de l'appareil de Golgi (Gkantiragas et al., 2001), du réticulum endoplasmique (Smart et al., 1994) ainsi qu'au niveau des gouttelettes lipidiques (Fujimoto et al., 2001; Le Lay et al., 2006; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001). De plus, certains types cellulaires comme les lymphocytes ou les neurones expriment cavéoline-1 et sont dépourvues de cavéoles. En accord, les cavéoline-1 et -3 exprimées dans les lymphocytes et les macrophages bovins se localisent uniquement au niveau de l'appareil de Golgi, et pas à la membrane plasmique (Harris et al., 2002). Enfin, l'animal modèle *Caenorhabditis elegans* exprime un isoforme de cavéoline-1 ne permettant pas la formation de cavéoles (Kirkham et al., 2008).

2.1.2. Les cavines, nouvelles protéines associées aux cavéoles

Les cavéolines ont longtemps été considérées comme nécessaires et suffisantes pour la formation des cavéoles, mais récemment une nouvelle famille de protéines associées aux cavéoles a été mise en évidence. La localisation de PTRF (*polymerase and transcript release factor*) dans les cavéoles est connue depuis 2001 (Vinten et al., 2001), mais c'est seulement en 2008 que deux publications ont démontré le rôle de PTRF/cavine-1 dans la formation et la stabilisation de ces structures (Hill et al., 2008; Liu and Pilch, 2008). Peu après, par homologie de séquence, trois autres protéines associées aux cavéoles ont été mises en évidence (Bastiani et al., 2009; Hansen et al., 2009; McMahon et al., 2009). En conséquence, ces quatre nouvelles protéines impliquées dans la formation des cavéoles ont été regroupées dans la même famille : les protéines cavines. Ces nouvelles données apportées par l'étude des protéines cavines concernant la structure et les fonctions des cavéoles ont fait l'objet d'une revue à laquelle j'ai contribué ((Briand et al., 2011a) / **Annexe II**).

2.1.2.1. Structure des cavines

Les cavines 2 à 4 ont été mise en évidence par homologie de structure avec cavine-1. En effet, les cavines partagent une structure primaire commune et sont caractérisées par leur domaine N-terminal conservé (Gustincich et al., 1999; Xu et al., 2001) (**figure 12**).

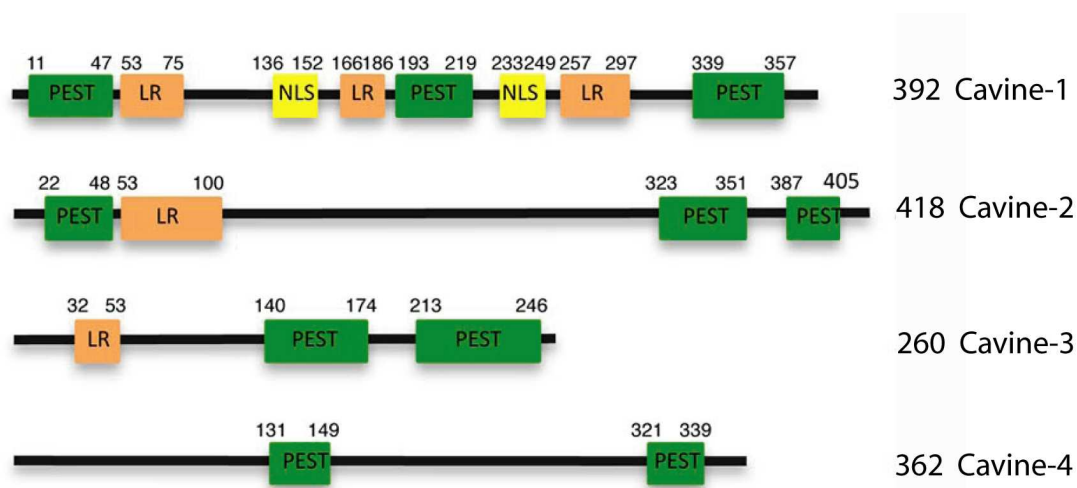


Figure 12 : Structure des protéines cavines humaines

Chez l'homme, toutes les cavines présentent plusieurs séquences PEST c'est-à-dire riches en proline et en acide glutamique. Les cavines 1 à 3 possèdent également des séquences riches en leucine (LR). En revanche, seule la cavine-1 possède deux séquences de localisation nucléaire. D'après (Bastiani et al., 2009)

Les cavines 1 à 3 contiennent au moins un domaine riche en résidus leucine (*leucine zipper*). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ce domaine est nécessaire pour la localisation cavéolaire de cavine-2 et cavine-3 dans des fibroblastes humains (McMahon et al., 2009). Toutes les cavines possèdent plusieurs domaines PEST, c'est-à-dire riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine, qui pourraient jouer un rôle dans leur dégradation protéolytique (Bastiani et al., 2009). Ces protéines sont capables de lier les PS et présentent de nombreux sites de phosphorylation (Aboulaich et al., 2004). En particulier, cavine-2 et cavine-3 sont des substrats de la protéine kinase C (PKC) (Mineo et al., 1998).

En raison de nombreuses modifications post-traductionnelles, le poids moléculaire des cavines n'est pas déterminé de manière formelle. Les cavines apparaissent souvent en bandes multiples dans les Westerns Blots, mais on estime leurs poids moléculaires à 55 KDa pour cavine-1, 72 KDa pour cavine-2 et 43 KDa pour cavine-3 et cavine-4.

2.1.2.2. Fonctions des cavines au sein des cavéoles

Dès 2001, **cavine-1**/PTRF a été identifiée comme étant une protéine cavéolaire, et une corrélation entre l'expression de cavéoline-1 et de cavine-1 et l'abondance de cavéoles a été observée (Vinten et al., 2005; Voldstedlund et al., 2001). En effet, le profil d'expression de cavine-1 recouvre ceux de cavéoline-1 et cavéoline-3, avec l'expression la plus forte observée dans le TA et le poumon (Vinten et al., 2001).

La présence de cavine-1 dans les cavéoles a depuis été confirmée par des méthodes de microscopie confocale ou électronique, ainsi que par des méthodes biochimiques. En réalisant des expériences de FRET (*fluorescence resonance energy transfert*), l'équipe de R. Parton a pu démontrer la proximité entre cavine-1 et cavéoline-1 à la membrane plasmique (Hill et al., 2008). Cependant, le fait qu'un désassemblage des cavéoles réduit cette interaction suggère une liaison indirecte *via* des lipides membranaires (Liu and Pilch, 2008). En accord, cavéoline-1 et cavine-1 ne co-précipitent plus lorsque les cavéoles sont solubilisées. Cette interaction pourrait impliquer les phosphatidylsérines. En effet, la capacité de cavéoline-1 à former des domaines membranaires riches en PS a été démontrée *in vitro*, et cavine-1, comme les autres cavines, peut lier aussi ces phospholipides.

Différentes stratégies ont été mises en œuvre pour établir le rôle de cavine-1 dans la formation des cavéoles. Dans les cellules PC3, qui expriment fortement cavéoline-1 mais pas cavine-1, l'expression de cavine-1 suffit à générer des cavéoles (Hill et al., 2008). Cavine-1

est donc un facteur limitant pour la formation de ces structures. D'autre part, la mise sous silence de cavine-1 grâce à un petit ARN interférent dans des fibroblastes 3T3-L1 induit une diminution drastique du nombre de cavéoles et une perte d'expression de cavéoline-1. Ces résultats ont conduit à attribuer à cavine-1 un rôle de stabilisation des cavéoles (**figure 13**).

Cavine-2/SDPR a été identifiée par deux groupes distincts, d'une part comme une protéine liant les phosphatidylsérines (Burgener et al., 1990) et d'autre part comme une protéine induite durant une privation en sérum (SDPR pour *serum deprivation protein response*) (Gustincich and Schneider, 1993). L'association de cavine-2 avec les cavéoles a été mise en évidence dès 1998 (Mineo et al., 1998). En 2009, le groupe de B. Nichols a montré que cavine-2 est impliquée dans la formation des cavéoles (Hansen et al., 2009). En effet, une diminution de l'expression de cavine-2 induit une perte de l'expression de cavine-1 et cavéoline-1, avec pour conséquence une diminution du nombre de cavéoles. Ceci implique une interdépendance de ces trois protéines pour la formation des cavéoles. La surexpression de cavine-2 ne permet pas d'augmenter le nombre de cavéoles, mais induit la formation de tubules à la membrane plasmique. Cavine-2 pourrait donc jouer un rôle déterminant dans la morphologie des cavéoles (**figure 13**).

Des études de protéomique menées sur des fractions cavéolaires ont permis de détecter pour la première fois **cavine-3/SRBC** (*sdr-related gene product that binds to c-kinase*) dans ces structures (Aboulaich et al., 2004; McMahon et al., 2006). Cette localisation, confirmée par la suite par immunofluorescence, nécessite l'expression de cavéoline-1 (McMahon et al., 2009). Cavine-3 est associée aux cavéoles internalisées, et le trafic intracellulaire de cavéoline-1 est limité en l'absence de cavine-3. Ces résultats suggèrent un rôle potentiel de cavine-3 dans la régulation de la mobilité des cavéoles (**figure 13**).

Cavine-4/MURC4, l'isoforme des cavines spécifique du muscle, présente une localisation intracellulaire similaire à celle de cavéoline-3 (Ogata et al., 2008). Cette distribution intracellulaire est modifiée dans les muscles de patients présentant une mutation sur le gène codant pour cavéoline-3 (Bastiani et al., 2009). Aucune expérience de perte de fonction n'a jusqu'à maintenant permis de déterminer si cavine-4 joue un rôle limitant pour la formation des cavéoles musculaires.

Les différentes expériences où l'expression des cavines a été modulée ont permis de mettre en exergue la forte interdépendance de ces protéines pour leur stabilité. En effet, dans des lignées cellulaires déficientes pour cavine-1, les expressions de cavéoline-1, cavine-2 et

cavine-3 sont diminuées (Bastiani et al., 2009). En particulier, cavéoline-1 va être ubiquitinylée puis dirigée vers le système lysosomal où elle sera dégradée (Hayer et al., 2010b). De la même manière, l'expression de cavéoline-1 et cavine-1 est réduite en l'absence de cavine-2 (Bastiani et al., 2009). Enfin, l'expression des cavines -1 à -3 est réduite de manière drastique dans les souris déficientes pour cavéoline-1 (Liu and Pilch, 2008). L'association de cavéoline-1 et des cavines dans les cavéoles semble donc être un facteur important pour la stabilité de ces protéines.

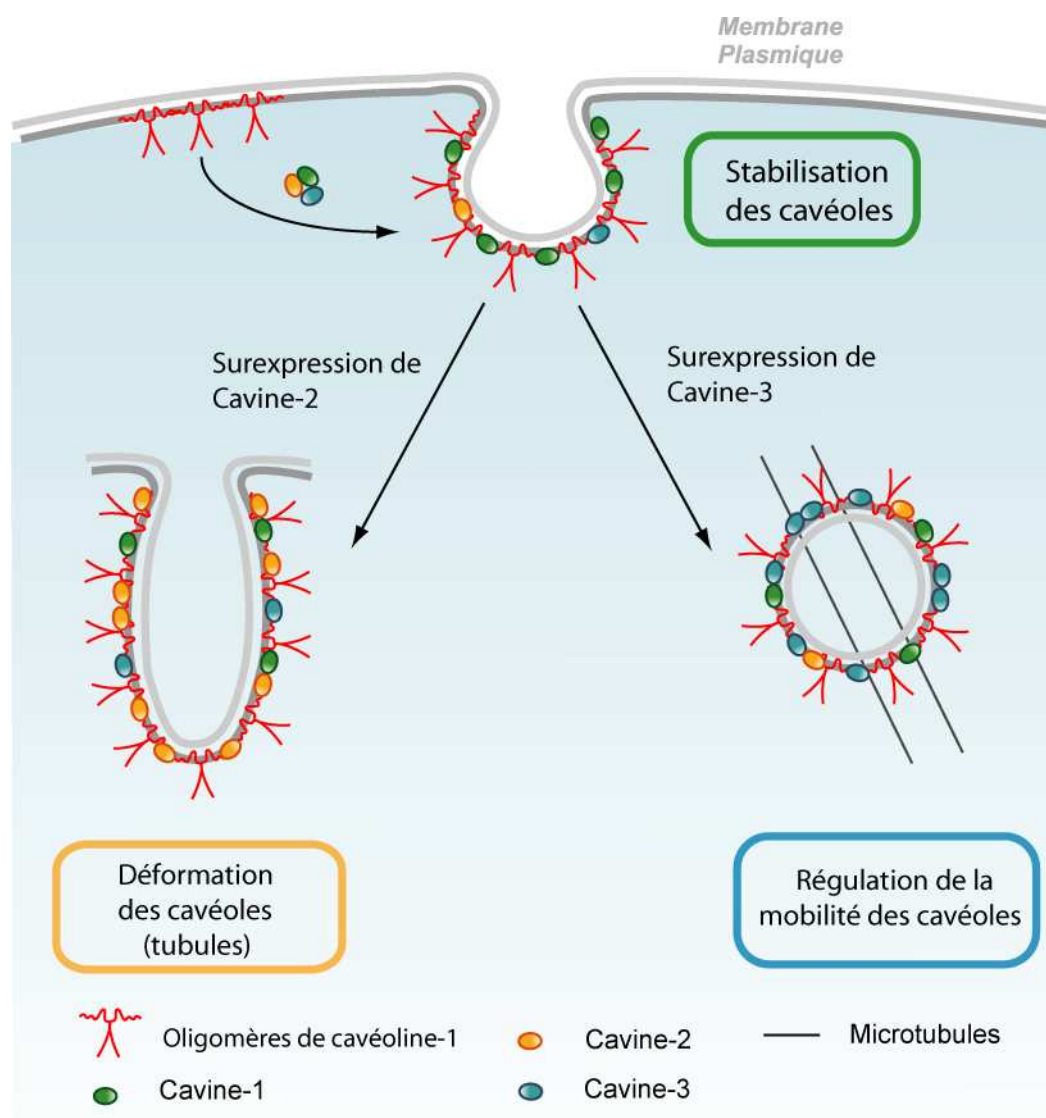


Figure 13 : Fonctions des protéines cavines au sein des cavéoles

Le complexe des cavines s'associe aux cavéoles invaginées au niveau de la membrane plasmique. La surexpression des cavines modifie la quantité, la morphologie et la dynamique des cavéoles. La surexpression de cavine-2 induit la formation de tubules tandis que la surexpression de cavine-3 augmente la mobilité des cavéoles. D'après (Briand et al., 2011a).

2.2. Formation des cavéoles

Une étude récente menée par le groupe d'A. Helenius a permis d'établir les différentes étapes de l'assemblage des cavéoles (Hayer et al., 2010) (**figure 14**).

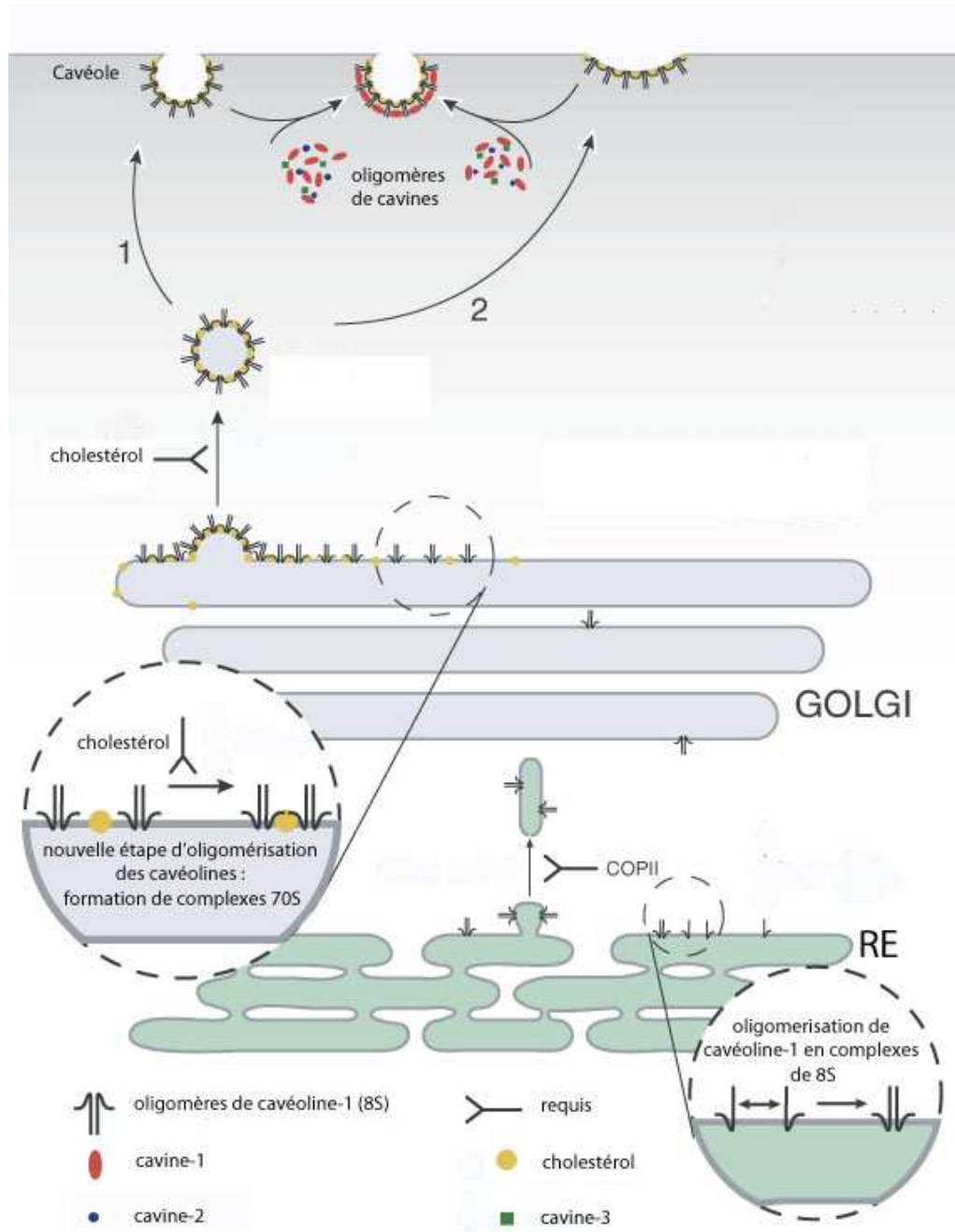


Figure 14 : Modèle d'assemblage des cavéoles

Les cavéolines subissent deux étapes d'oligomérisation successives au niveau du réticulum endoplasmique (RE) puis de l'appareil de Golgi. L'adressage des cavéolines vers la membrane plasmique est un processus dépendant du cholestérol. Deux modèles sont présentés pour l'assemblage des cavéoles. Les cavéolines pourraient stabiliser les invaginations cavéolaires (1), ou permettre la formation des cavéoles invaginées à partir de domaines membranaires plats associées aux cavéolines (2). D'après (Hayer et al., 2010a).

Les cavéolines sont synthétisées dans le RE où elles adoptent leur conformation en épingle à cheveux (Monier et al., 1995) (Monier et al., 1995). Elles vont alors former dans le RE des oligomères de bas poids moléculaire (7 cavéolines) qui sont dirigés vers l'appareil de Golgi *via* des vésicules COPII où une seconde étape dans l'oligomérisation de ces protéines (144 cavéolines) a lieu. Les cavéolines vont être palmitoylées dans l'appareil de Golgi puis adressées à la membrane plasmique. Il a par ailleurs été établi que le contenu en cholestérol des cellules est limitant pour le trafic de cavéoline-1 de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique (Pol et al., 2005). Le complexe des cavines est ensuite recruté.

Les cavines sont constitutivement associées dans le cytosol sous forme d'oligomères comprenant 60 à 80 cavines (Bastiani et al., 2009). Ce complexe est recruté à la membrane plasmique par cavéoline-1, selon un processus dépendant de la cavine-1. En revanche, les cavines ne s'associent pas aux cavéolines dans l'appareil de Golgi. Ceci implique que la cavine-1 reconnaît et s'associe avec les cavéolines spécifiquement au niveau de la membrane plasmique, ou plus précisément au domaine lipidique particulier de la membrane plasmique généré par les oligomères de cavéolines.

2.3. Fonctions des cavéoles

La genèse de modèles de souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1 a permis de mettre à jour l'implication des cavéoles dans de nombreux processus physiologiques. En effet, l'absence de cavéoles dans tous les tissus non musculaires conduit à deux phénotypes majeurs : un phénotype adipeux caractérisé par une lipotrophie associée à une hyperlipémie (Razani et al., 2002a), et un phénotype cardiovasculaire lié à un dysfonctionnement endothélial (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001) (**Tableau 1**).

2.3.1. Les cavéoles constituent des plateformes de signalisation

2.3.1.1. Ségrégation des protéines de signalisation dans les cavéoles

La capacité de cavéoline-1 à lier des protéines de signalisation et à réguler leur activité a été l'objet de nombreuses études. Le site d'interaction de cavéoline-1 avec ces protéines, appelé CSD pour «*caveolin scaffolding domain*», est situé en N-terminal et inclut le domaine d'oligomérisation (Wanaski et al., 2003). Certaines des protéines se liant à cavéoline-1

Phénotypes	Références
<p>Perte des structures cavéolaires</p> <p>Absence de cavéoles dans tous les tissus non-musculaires</p> <p>Déficience quasi-totale des protéines associées aux cavéoles (cavéoline-2 et cavines)</p>	<p>(Drab et al., 2001) / (Razani et al., 2001)</p> <p>(Drab et al., 2001) / (Hill et al., 2008)</p>
<p>Dysfonction métabolique des tissus adipeux</p> <p>Lipoatrophie, résistance à l'obésité induite par régime gras, hyperlipémie</p> <p>Sensibilité diminuée à la stimulation β-adrénergique</p> <p>Remodelage tissulaire: infiltration macrophagique et autophagie constitutivement active</p> <p>Dysfonction mitochondriale</p>	<p>(Razani et al., 2002a)</p> <p>(Cohen et al., 2004) / (Mattsson et al., 2010)</p> <p>(Briand et al., 2011b) / (Le Lay et al., 2010)</p> <p>(Wernstedt, I et al., 2012)</p>
<p>Dysfonction endothéliale</p> <p>Production accrue de NO consécutive à l'activation de l'eNOS</p> <p>Diminution du tonus vasculaire</p> <p>Hyperperméabilité vasculaire</p> <p>Hypertrophie cardiaque et hypertension pulmonaire</p> <p>Altérations de la réponse angiogénique</p>	<p>(Drab et al., 2001)</p> <p>(Drab et al., 2001) / (Razani et al., 2001)</p> <p>(Schubert et al., 2002)</p> <p>(Zhao et al., 2002) / (Cohen et al., 2003b)</p> <p>(Woodman et al., 2003)</p>
<p>Autres phénotypes</p> <p>Sensibilité à la tumorigénèse</p> <p>Altérations de la glande mammaire et de la lactation</p> <p>Altérations urogénitales (hypertrophie des vésicules séminales)</p>	<p>(Razani et al., 2001) / (Capozza et al., 2003)</p> <p>(Park et al., 2002)</p> <p>(Woodman et al., 2004)</p>

Tableau 1 : Phénotypes observés chez les souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1

possèdent les séquences consensus $\Phi x \Phi x x x x \Phi$ ou $\Phi x x x x \Phi x x \Phi$, où Φ représente un acide aminé aromatique. Ces séquences sont appelées CBD pour *caveolin binding domain* (Couet et al., 1997). Il est communément admis que la liaison à la cavéoline-1 a, de manière générale, un effet inhibiteur sur les protéines de signalisation. Notamment, des récepteurs tyrosines kinases comme l'EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Couet et al., 1997) ou le PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) (Yamamoto et al., 1999) sont des cibles connues de cavéoline-1, régulées négativement par leur interaction avec le CSD. Néanmoins, toutes les protéines liant cavéoline-1 ne possèdent pas de site consensus, et la liaison à cavéoline-1 n'est pas systématiquement inhibitrice (Czarny et al., 1999).

Les cavéoles sont considérées comme des plateformes de signalisation. La compartimentation à la fois spatiale et temporelle des protéines de signalisation au sein de ces domaines facilite les cascades de signalisation. Notamment, plusieurs acteurs de la voie de la lipolyse tels que les récepteurs α - et β -adrénergiques, les protéines G et l'adénylate cyclase sont localisés dans les cavéoles. Dans les adipocytes bruns déficients pour cavéoline-1, la production d'AMPc est réduite en réponse à un agoniste β -adrénergique (Mattsson et al., 2010). Une régulation des voies de signalisation *via* l'internalisation des cavéoles a également été proposée (Echarri and Del Pozo, 2006; Parton et al., 1994). Toutefois, ces processus restent discutés au vu de la faible mobilité de ces structures, ancrées au cytosquelette d'actine et aux filamines (Stahlhut and Van Deurs, 2000).

La forme invaginée des cavéoles pourrait jouer un rôle important dans le recrutement de protéines. Une publication récente reporte l'existence d'un autre sous-type de radeau lipidique, contenant des oligomères de cavéoline-1 mais n'étant pas invaginé. L'analyse protéomique de ces domaines membranaires a révélé une composition restreinte par rapport à celle des cavéoles invaginées (Zheng et al., 2011). Le recrutement des cavéolines dans les cavéoles, dépendant de l'expression de cavine-1, modifie la capacité d'interaction de cavéoline-1 avec d'autres protéines. Le désassemblage des cavéoles pourrait donc être un moyen de réguler des voies de signalisation.

Il faut noter que certains biais techniques rendent difficile la caractérisation du protéome des cavéoles. En effet, les préparations de fractions résistantes aux détergents ne contiennent pas uniquement des cavéoles mais l'ensemble des radeaux lipidiques. D'autre part, la déplétion des cellules en cholestérol, utilisée pour désassembler les cavéoles, affecte

de nombreux autres processus cellulaires. Certains résultats obtenus avec ces techniques n'ont ainsi pas été confirmés par microscopie électronique, qui reste le seul moyen d'identifier formellement ces structures. Toutefois, l'étude des animaux déficients pour cavéoline-1 vient confirmer l'implication des cavéoles dans les processus de signalisation cellulaire (Le Lay et al., 2009).

2.3.1.2. L'exemple de la NO synthase endothéliale

Les souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1 (*Cav1* (-/-)) présentent un défaut du tonus vasculaire et une hyperperméabilité des capillaires sanguins, ainsi qu'une hypertrophie cardiaque et une hypertension pulmonaire (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001b). Ce phénotype peut être rétabli en administrant des inhibiteurs de la NO synthase endothéliale (Wunderlich et al., 2008a; Wunderlich et al., 2008b), en croisant ces souris avec des animaux déficients pour eNOS (Zhao et al., 2009), ou encore en réexprimant cavéoline-1 de manière spécifique dans les cellules endothéliales (souris *cav1* RC) (Yu et al., 2006a). Ceci implique que la dérégulation d'eNOS en l'absence de la cavéoline-1 endothéliale est à l'origine de ces défauts cardiovasculaires.

La NO synthase endothéliale est une enzyme membranaire qui catalyse la production d'oxyde nitrique (NO) *via* l'oxydation de l'arginine en citrulline. Le NO joue un rôle majeur dans l'angiogénèse, la perméabilité vasculaire et dans la régulation de la pression artérielle. Classiquement, eNOS est activée en réponse à une décharge calcique, induite par exemple par le VEGF. Le calcium va alors se lier à la calmoduline, et ce complexe va interagir avec eNOS pour activer la synthèse de NO. Par ailleurs, le stress mécanique induit par une pression sanguine élevée peut également activer eNOS indépendamment de la calmoduline.

La NO synthase endothéliale est localisée dans les cavéoles (Shaul et al., 1996) où elle interagit avec le CSD de cavéoline-1, cette interaction ayant un effet inhibiteur (Feron et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1996a). En conséquence, la synthèse de NO basale est accrue dans les cellules endothéliales des souris déficientes pour cavéoline-1 (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001). Une étude récente a démontré que cette inhibition repose sur la F92 du CSD. En effet, la cavéoline-1 mutée F92A interagit toujours avec eNOS mais l'effet inhibiteur de cette interaction est perdu (Bernatchez et al., 2011). Lors d'une décharge calcique, la calmoduline va agir comme un compétiteur allostérique et détacher le complexe cavéoline-1/eNOS (**figure 15**).

Paradoxalement, bien que la liaison d'eNOS à la cavéoline-1 soit inhibitrice, la localisation d'eNOS dans les cavéoles peut être requise pour son activation. Notamment, le récepteur au VEGF est localisé dans les cavéoles. Dans les cellules endothéliales issues de souris déficientes pour cavéoline-1, la production de NO en réponse au VEGF est diminuée en raison d'une activation partielle de l'enzyme (Sonveaux et al., 2004). La cavéoline-1 va donc à la fois inhiber eNOS en l'absence de stimulus et favoriser son activation en maintenant les acteurs de la cascade de signalisation au sein des cavéoles. De ce fait, les cavéoles participent au contrôle de la perméabilité vasculaire et de la pression artérielle.

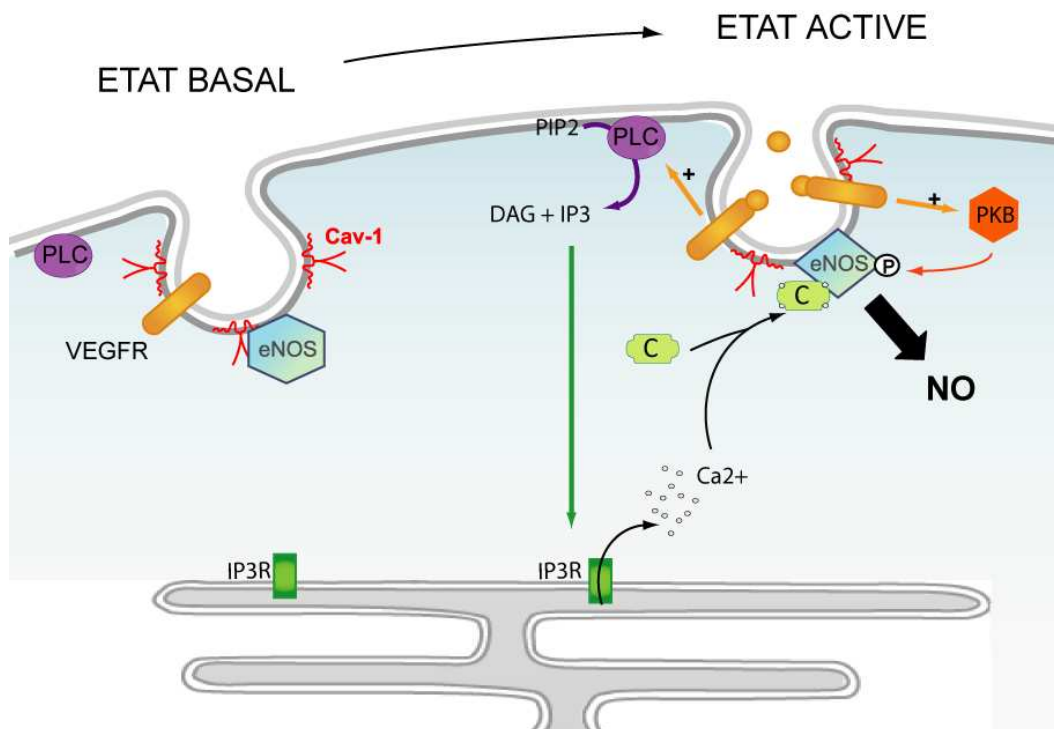


Figure 15 : Activation de la NO synthase endothéliale en réponse au VEGF

Dans les cavéoles, la NO synthase endothéliale (eNOS) est maintenue dans un état inactivé par sa liaison à cavéoline-1 (Cav-1). La liaison du VEGF sur son récepteur (VEGFR), localisé dans les cavéoles, va induire différentes voies de signalisation conduisant à l'activation d'eNOS. Le VEGFR va activer la phospholipase C (PLC) qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) en inositol-3-phosphate (IP3) et diacylglycérol. L'IP3 va diffuser dans le cytoplasme pour lier son récepteur (IP3R) situé au niveau du réticulum endoplasmique, provoquant une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire. En conséquence, la calmoduline (C) complexée au calcium va s'associer avec eNOS et l'activer, la libérant de son interaction avec cavéoline-1. D'autre part, le VEGFR active la protéine kinase B qui va phosphoryler eNOS et augmenter son activation. L'eNOS activée produit du NO et de la citrulline à partir d'arginine et d'O₂.

2.3.1.3. L'exemple de la signalisation insulinique

De manière générale, les cavéolines sont considérées comme des inhibiteurs des protéines avec lesquelles elles interagissent. De manière surprenante, la signalisation insulinique semble être la seule voie régulée positivement par les cavéolines.

L'action de l'insuline est initiée par sa liaison à son récepteur conduisant à l'activation de ce dernier par autophosphorylation. Une fois activé, le récepteur à l'insuline (RI) phosphoryle différents substrats parmi lesquels les protéines de la famille *insulin receptor substrate* IRS1/2/3/4 (pour revue (Pessin and Saltiel, 2000)). Ces IRS recrutent alors à la membrane plasmique la sous-unité régulatrice de la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3 kinase) qui catalyse la synthèse de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3). L'augmentation de la concentration en PIP3 qui en résulte a pour conséquence le recrutement à la membrane plasmique de la protéine kinase 1 dépendante des 3-phosphoinositides (PDK1) qui est alors activée. Cette dernière va activer la protéine kinase B (PKB) jouant un rôle important dans les effets de l'insuline sur le transport du glucose.

Un des moyens d'évaluer l'action de l'insuline est de mesurer l'état de phosphorylation de ses substrats intracellulaires tels qu'IRS1/2 ou PKB. Les défauts d'activation de ces molécules ont pour conséquence une incapacité de l'insuline à exercer ses fonctions métaboliques dans le muscle squelettique, le foie, ou la tissu adipeux (pour revue (Biddinger and Kahn, 2006)). Par une approche utilisant la transfection de cavéoline-1 ou -3 dans des cellules HEK (*human embryonic kidney*), il a été montré que l'expression de ces isoformes de cavéoline était suffisante pour induire la phosphorylation d'IRS1 après une stimulation par l'insuline (Yamamoto et al., 1998). Ces résultats ont introduit le concept selon lequel la cavéoline contribue à l'activation du récepteur à l'insuline.

Dans les adipocytes, la localisation subcellulaire du récepteur à l'insuline a fait l'objet de plusieurs études aux résultats divergents. Des études s'appuyant sur des techniques de microscopie électronique, d'isolement biochimique des cavéoles et d'immunoprécipitation de la cavéoline-1 avec le RI ont apporté des arguments en faveur de la localisation du RI dans les cavéoles (Gustavsson et al., 1999; Kimura et al., 2002; Nystrom et al., 1999; Yamamoto et al., 1998). Néanmoins, deux études utilisant des outils similaires ne permettent pas de conclure à une localisation cavéolaire du RI (Mastick et al., 1995; Souto et al., 2003). Ces résultats

divergents pourraient être conciliés par l'observation du RI au niveau du col des cavéoles et non pas dans la partie invaginée (Foti et al., 2007).

L'analyse des modèles murins déficients pour cavéoline-1 a permis d'avancer dans la compréhension du rôle des cavéolines dans la signalisation insulinaire. Les souris *Cav1* (-/-) sont dépourvues de cavéoles dans tous les tissus non musculaires et développent avec l'âge un phénotype lipoatrophique (Razani et al., 2002a). Lorsqu'elles sont placées sous régime gras pendant 9 mois, ces souris transgéniques développent une résistance à l'insuline caractérisée par une hyperinsulinémie postprandiale. Par ailleurs, une mutation non-sens homozygote sur le gène de la cavéoline-1 chez l'homme a pour conséquence une lipodystrophie associée à une résistance à l'insuline très sévère (cf. § 3.3). Le phénotype des souris *Cav1* (-/-) peut être en grande partie expliqué par un défaut de signalisation insulinaire au niveau adipocytaire (Cohen et al., 2003). En effet, le niveau d'expression protéique du récepteur à l'insuline est diminué de manière drastique, sans modification du niveau d'expression génique, suggérant une déstabilisation du RI dans les adipocytes en l'absence de cavéoles/cavéoline. Toutefois, le phénotype lipoatrophique des souris *Cav1* (-/-) n'est pas strictement similaire à celui des souris transgéniques FIRKO (*Fat specific Insulin Receptor Knock-Out*), invalidées pour le récepteur à l'insuline spécifiquement au niveau du tissu adipeux (Bluher et al., 2002).

La voie de signalisation insulinaire est à ce jour la seule voie de signalisation connue étant modulée positivement par les cavéolines. Cette action positive s'exercerait *via* la stabilisation du récepteur à l'insuline au niveau de la membrane plasmique et par une régulation positive des acteurs situés en aval du RI.

2.3.2. La transcytose cavéolaire

Outre la régulation de la NO synthase endothéliale par cavéoline-1, une autre fonction des cavéoles apparaît importante pour la perméabilité de l'endothélium. Par analogie avec le processus très bien documenté d'endocytose *via* les puits de clathrine, de nombreuses équipes se sont attachées à rechercher un rôle des cavéoles dans l'endocytose de molécules spécifiques (Montesano et al., 1982). L'endocytose cavéolaire reste un mécanisme controversé dans la plupart des types cellulaires, notamment en raison du fait que les cavéoles sont des structures très statiques. Cependant, des travaux démontrent un rôle des cavéoles dans les phénomènes de transcytose dans les cellules endothéliales (Oh et al., 1998).

Dans les cellules endothéliales, les cavéoles ont la capacité de transporter des molécules du lumen du vaisseau sanguin vers l'espace sous-endothélial. Ce processus appelé transcytose comprend l'endocytose dépendante d'un récepteur, le transport vésiculaire et l'exocytose de la molécule cargo à la membrane opposée. La transcytose de l'albumine *via* les cavéoles est un processus qui a fait l'objet de nombreuses études permettant ainsi l'identification des différents acteurs impliqués.

L'albumine a la capacité de lier les acides gras et les hormones stéroïdiennes. Dans les conditions physiologiques normales, l'albumine ne peut pas être transportée par la voie paracellulaire et son transport est principalement effectué par la transcytose cavéolaire. Comme l'endocytose dépendante des puits de clathrine, l'endocytose cavéolaire est un processus hautement régulé. En l'absence de stimulation, les cavéoles sont des structures statiques ancrées au cytosquelette d'actine. La liaison de l'albumine à son récepteur gp60 (glycoprotéine de 60 KDa) localisé dans les cavéoles (Tiruppathi et al., 1997) induit le regroupement des récepteurs et leur interaction physique avec cavéoline-1 (Minshall et al., 2000). La protéine kinase Src, liée au CSD de cavéoline-1, est activée en réponse à la liaison de gp60 sur cavéoline-1. Elle va alors phosphoryler cavéoline-1 sur la Tyr14, gp60, et la dynamine-2 (Shajahan et al., 2004a; Shajahan et al., 2004b). La dynamine-2 est une GTPase de haut poids moléculaire située sur le col des cavéoles et impliquée dans la fission des cavéoles. La phosphorylation de la dynamine-2 par la kinase Src permet sa liaison à cavéoline-1, augmente son activité GTPase et stimule la formation de la vésicule, sa fission et le transport transendothélial de l'albumine (Shajahan et al., 2004a) (**figure 16**).

Les souris déficientes pour cavéoline-1 présentent un défaut de transport de l'albumine, qui peut être rétabli par la réexpression de cavéoline-1 dans les cellules endothéliales (Drab et al., 2001; Razani et al., 2001; Schubert et al., 2001). Les défauts de transport de l'albumine sont classiquement associés à des œdèmes et à une hypercholestérolémie. Cependant, les souris cavéoline-1 KO ne présentent pas ce type de phénotype. En effet, en raison de l'activité d'eNOS augmentée et de la forte production de NO qui en résulte, la perméabilité vasculaire est accrue dans l'endothélium de ces animaux (Razani et al., 2001). L'albumine peut être alors transportée par la voie paracellulaire. Cavéoline-1 exerce donc un contrôle sur la perméabilité de l'endothélium à la fois de manière directe, en régulant la transcytose de l'albumine, et indirecte *via* la régulation d'eNOS.

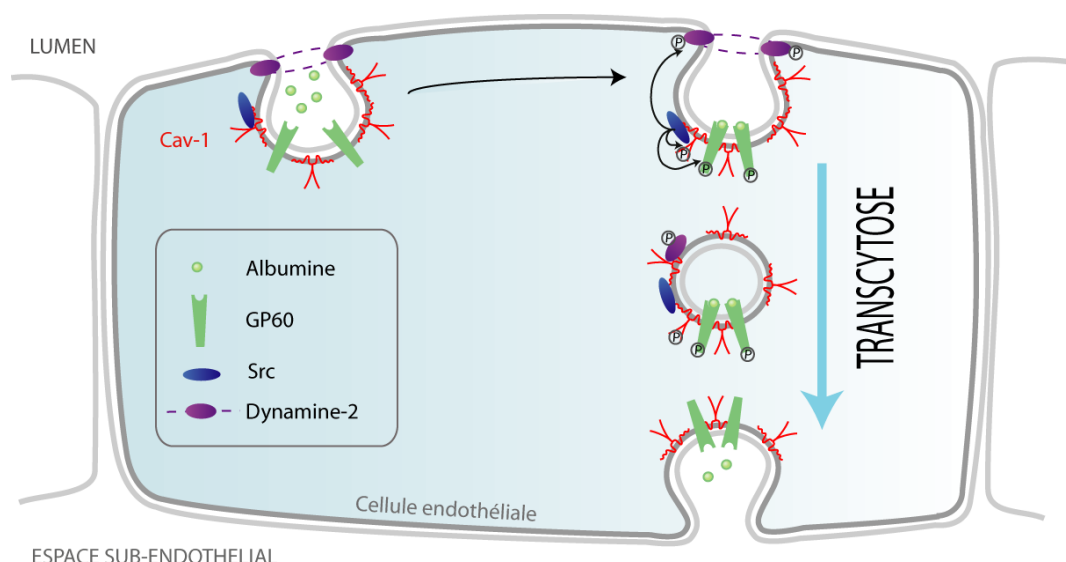


Figure 16 : Transcytose de l'albumine au travers de l'endothélium

La liaison de l'albumine sur les récepteurs GP60 provoque le regroupement des récepteurs et leur liaison à la cavéoline-1. Cette liaison va activer la kinase Src qui va phosphoryler cavéoline-1, GP60 et la dynamine-2. En conséquence, les cavéoles sont internalisées puis migrent vers le pôle basal de la cellule endothéliale où l'albumine est relarguée.

2.3.3. Cavéoles et métabolisme lipidique

Les cavéoles sont extrêmement abondantes dans les adipocytes, et de nombreuses données relient les cavéoles au métabolisme des lipides. Les données *in vitro* ont montré que les cavéolines sont capables de lier le cholestérol (Murata et al., 1995), les acides gras (Trigatti et al., 1999), et peuvent s'associer aux gouttelettes lipidiques (Fujimoto et al., 2001; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001).

L'étude des souris déficientes pour le gène de la cavéoline-1 est venue confirmer ce rôle de cavéoline-1 et des cavéoles dans le métabolisme lipidique. En effet, outre leur phénotype cardiovasculaire, ces souris présentent également un phénotype lipoatrophique qui s'accroît avec l'âge et qui se caractérise par une moindre adiposité, une hyperlipémie et une résistance à l'obésité induite par un régime hyperlipidique (Razani et al., 2002a). L'analyse histologique de coupes de tissus adipeux prélevés sur ces animaux transgéniques révèle des adipocytes de taille réduite par rapport à des adipocytes contrôles. De manière surprenante, cette lipoatrophie ne s'accompagne ni de dépôts ectopiques de lipides puisqu'aucune stéatose hépatique n'a été observée chez ces animaux, ni d'une résistance à l'insuline en régime standard. Cependant, l'absence de cavéoline-1 n'altère en rien la présence de cavéoles au

niveau musculaire (dépendant de cavéoline-3) ce qui pourrait expliquer que ces souris ne présentent pas d'altération du signal insulinaire. Les mécanismes conduisant à la lipotrophie en l'absence de cavéoline-1 restent mal compris. Le tissu adipeux des souris déficientes pour la cavéoline-1 présente une morphologie normale indiquant qu'un défaut de différenciation n'est pas à l'origine de ce phénotype. Ceci est de plus confirmé par le fait que les fibroblastes isolés à partir des embryons de souris *Cav1* (-/-) conservent un potentiel de différenciation adipocytaire normal *in vitro* (Cohen et al., 2004; Le Lay et al., 2006). Les études des capacités métaboliques de ces animaux montrent une légère hyperphagie mais une absorption intestinale normale et ne révèlent pas de dépense énergétique accrue (Razani et al., 2002a). Au contraire, le TA brun est même moins actif chez les souris *Cav1* (-/-) (Cohen et al., 2005). Un défaut dans la balance énergétique ne permet donc pas d'expliquer ce phénotype. Par conséquent, le phénotype lipotrophique des souris *Cav1* (-/-) résulterait d'un défaut de stockage lipidique, qui conduit à une élévation massive des acides gras libres et des triglycérides dans le sérum.

L'activité de la PKA est augmentée dans les adipocytes n'exprimant pas cavéoline-1, en accord avec les études montrant un rôle inhibiteur de cavéoline-1 sur cette kinase (Razani and Lisanti, 2001). Mais paradoxalement, la phosphorylation de la périlipine-1 en réponse à une stimulation lipolytique est réduite de manière drastique dans ces cellules (Cohen et al., 2004). Des expériences de co-immunoprécipitation à partir d'adipocytes traités avec un agoniste β 3-adrénergique ont montré l'existence d'un complexe formé par la cavéoline-1, la périlipine-1 et la sous-unité catalytique de la PKA (**figure 17**). Plus récemment, une étude a révélé l'implication de cavine-1 dans régulation de la lipolyse (Aboulaich et al., 2011). En effet, suite à une stimulation β 3-adrénergique, cavine-1 va être phosphorylée sur plusieurs sites par la PKA. De plus, la réponse lipolytique est diminuée dans des adipocytes 3T3-L1 où l'expression de cavine-1 a été spécifiquement inhibée. Cependant, ce dernier résultat est probablement lié à une diminution concomitante de l'expression de cavéoline-1. En accord avec ces résultats obtenus *in vitro*, les adipocytes isolés à partir du TA des souris *Cav1* (-/-) présentent une réponse lipolytique altérée lorsqu'ils sont soumis à une stimulation β 3-adrénergique (Cohen et al., 2004). La lipotrophie des souris *Cav1* (-/-) ne peut donc pas s'expliquer par une activité lipolytique accrue dans le TA de ces animaux.

L'association des cavéolines avec les GLs, décrite dans un premier temps lors de l'expression de formes mutantes (Pol et al., 2001) ou dans des cellules non adipeuses (Ostermeyer et al., 2001), a également été observée dans des adipocytes (Le Lay et al., 2006).

Dans les adipocytes des souris *Cav1* (-/-), le contenu en cholestérol des GLs est diminué, suggérant un rôle de cavéoline-1 dans le maintien du contenu en cholestérol libre de cet organelle (Le Lay et al., 2006). De plus, la translocation de la cavéoline-1 à la surface des GL dans la lignée adipocytaire 3T3-L1 est stimulée en quelques minutes par l'ajout de cholestérol ou d'acides gras. Ce trafic de cavéoline-1 vers la GL en réponse aux lipides est un processus dépendant de la dynamine et de la protéine kinase C, et modulé par l'activation de la protéine kinase Src. Ce processus s'apparente donc à l'endocytose cavéolaire. En accord avec cette idée, l'addition de cholestérol induit le bourgeonnement des cavéoles de la membrane plasmique. La cavéoline pourrait donc être un transporteur de lipides entre le RE, la membrane plasmique et la GL (**figure 17**). Cependant, si on considère qu'une molécule de cavéoline-1 ne peut lier qu'une molécule de cholestérol (Murata et al., 1995), il s'agirait alors d'un transport limité.

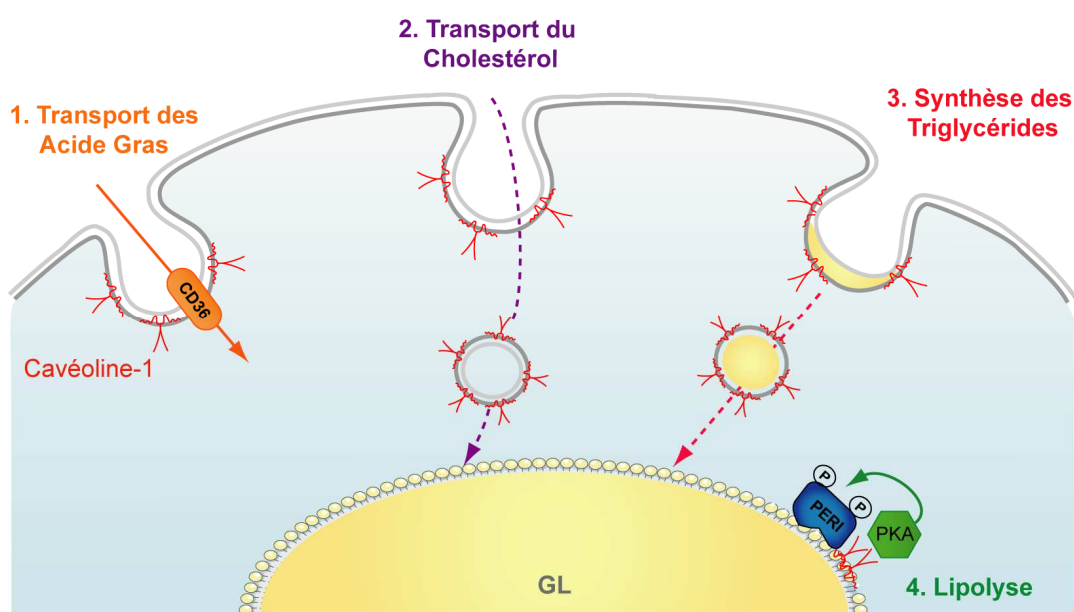


Figure 17 : Cavéoles et métabolisme lipidique

Les cavéoles sont impliquées dans le métabolisme lipidique de l'adipocyte à différents niveaux. Des transporteurs d'acides gras comme FAT/CD36 sont localisés dans les cavéoles (1). Les cavéolines sont adressées à la gouttelette lipidique (GL) en réponse à une charge de cholestérol ce qui suggère un rôle dans le transport du cholestérol (2). Une synthèse de triglycérides a été observée au niveau des cavéoles (3). La cavéoline-1 forme un complexe avec la périlipine-1 et la PKA. En l'absence de cavéoline-1, la réponse lipolytique de l'adipocyte est diminuée (4).

Enfin, plusieurs études reportent un rôle des cavéoles dans le transport des acides gras. En effet, des transporteurs d'acides gras comme FAT/CD36 (*fatty acid translocase*) sont

présents dans les cavéoles (Souto et al., 2003) (**figure 17**). En conséquence, le transport des acides gras est diminué dans les fibroblastes embryonnaires des souris *Cav1* (-/-) différenciés en adipocytes, en lien avec la présence réduite de CD36 à la surface des cellules (Ring et al., 2006). Le groupe de P. Stralfors a par ailleurs observé une synthèse de TG de novo dans des fractions cavéolaires purifiées à partir d'adipocytes humains (Ost et al., 2005), suggérant l'existence d'une sous-classe de cavéoles qui pourrait contenir les enzymes nécessaires à l'estérification des acides gras en TG (**figure 17**). Les cavéoles pourraient donc être le site de biogénèse de nouvelles GLs qui fusionneraient ensuite avec la GL principale de l'adipocyte.

2.3.4. Réponse au stress mécanique

Les cavéolines sont fortement exprimées dans des cellules soumises à des contraintes mécaniques, comme les cellules endothéliales et les cellules musculaires. Plus particulièrement, la surface luminale des cellules endothéliales est soumise à des variations de pression, ainsi qu'à des contraintes de cisaillement («*shear stress*») liées au flux sanguin. En réponse, la NO synthase endothéliale va être phosphorylée et activée, induisant une relaxation vasculaire. Des tensions mécaniques chroniques vont également activer la voie des MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinases provoquant à terme un remodelage des vaisseaux sanguins.

Ces réponses vasculaires aiguës et chroniques induites par un stress mécanique sont altérées chez les souris *Cav1* (-/-). Bien que la NO synthase endothéliale soit inhibée à l'état basal par cavéoline-1, sa phosphorylation en réponse à un stimulus mécanique est diminuée chez les souris *Cav1* (-/-). L'activation d'eNOS en réponse à des variations de pression sanguine nécessite donc son couplage aux cavéoles. De plus, une réduction chronique de la pression sanguine n'induit pas de réduction du diamètre luminal des vaisseaux chez ces souris, indiquant un défaut du remodelage vasculaire. Ce phénotype vasculaire est totalement corrigé par la réexpression spécifique de cavéoline-1 dans l'endothélium (souris *cav1* RC) (Yu et al., 2006b). Au niveau cellulaire, l'exposition chronique à des tensions mécaniques provoque une redistribution de cavéoline-1 de l'appareil de Golgi vers la membrane plasmique et donc une augmentation du nombre de cavéoles à la surface des cellules (Boyd et al., 2003). Ces changements s'accompagnent d'une sensibilité accrue aux stimuli mécaniques.

L'observation de très nombreuses cavéoles dans les cellules musculaires lisses et striées a très tôt conduit à supposer que ces structures pourraient s'aplanir en cas d'étirement

(Dulhunty and Franzini-Armstrong, 1975). Cette théorie de «réservoir de membrane», validée du point de vue biophysique (Sens and Turner, 2006), a récemment été démontrée expérimentalement. Lors d'un choc hypo-osmotique, le gonflement de la cellule provoque l'activation de canaux chlore mécano-sensibles (Kozera et al., 2009). Dans des myocytes exposés à une solution hypotonique, ces canaux sont activés plus rapidement en l'absence de cavéoles. Les cavéoles constitueraient donc une réserve de membrane permettant de limiter l'activation des canaux sensibles aux variations de tension de la membrane plasmique. En effet, dans les cellules endothéliales et musculaires lisses, une tension mécanique ou un choc osmotique provoquent un désassemblage rapide des cavéoles, lié à la perte d'interaction entre cavéoline-1 et cavine-1 (Sinha et al., 2011) (**figure 18**). Le réassemblage de ces cavéoles est un processus lent, dépendant de l'actine et de l'ATP. D'autre part, le désassemblage des cavéoles pourrait potentiellement induire le relargage des protéines séquestrées dans les cavéoles et ainsi moduler la signalisation cellulaire en réponse au stress mécanique.

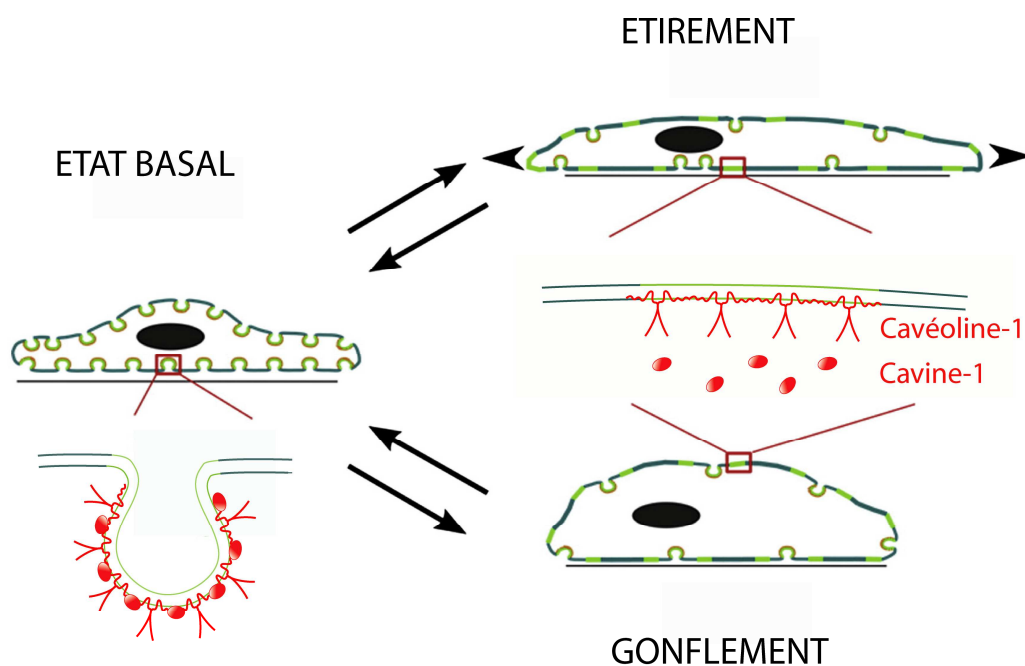


Figure 18 : Désassemblage des cavéoles en réponse au stress mécanique

Un stress mécanique aigu induit un désassemblage rapide des cavéoles dû à une perte d'interaction entre cavéoline-1 et cavine-1. Les cavéoles sont ensuite réassemblées par un processus dépendant de l'ATP. Ce mécanisme permet d'absorber les tensions et d'éviter la rupture de la membrane plasmique. D'après (Sinha et al., 2011).

On peut envisager que les adipocytes, au même titre que les cellules endothéliales ou musculaires, sont également soumis à des variations de tension membranaire. En effet, la

taille d'un adipocyte doit s'adapter en permanence au statut nutritionnel de l'organisme et peut donc varier considérablement (d'un facteur 10) sur une période très limitée.

Depuis la découverte des cavéoles dans les années 1950, l'étude de ces structures membranaires et des protéines associées a généré près de 6000 publications scientifiques. Malgré ces recherches intensives, les multiples fonctions des cavéoles ne sont pas totalement élucidées à ce jour, et de nouvelles fonctions ont été récemment révélées à l'instar de leur rôle dans la régulation du stress mécanique. Toutefois, les découvertes récentes concernant le rôle des cavéoles dans la régulation des tensions membranaires et l'implication des protéines cavines dans la formation et la fonction de ces structures ouvrent de nouvelles perspectives de recherche. Notamment, les cavines constituent de bons gènes candidats pour les pathologies humaines dans lesquelles les cavéolines ont déjà été impliquées.

3. Rôle critique des cavéoles dans les pathologies humaines

Ces dernières années, des mutations sur les gènes codant pour les cavéolines et cavine-1 ont été détectées dans plusieurs pathologies chez l'homme, indiquant clairement l'importance des cavéoles en physiologie humaine.

3.1. Rôles controversés des protéines cavéolaires dans les cancers

Cavéoline-1 joue un rôle ambigu dans les cancers dans le sens où elle peut agir à la fois comme un pro- et un anti-oncogène (**figure 19**).

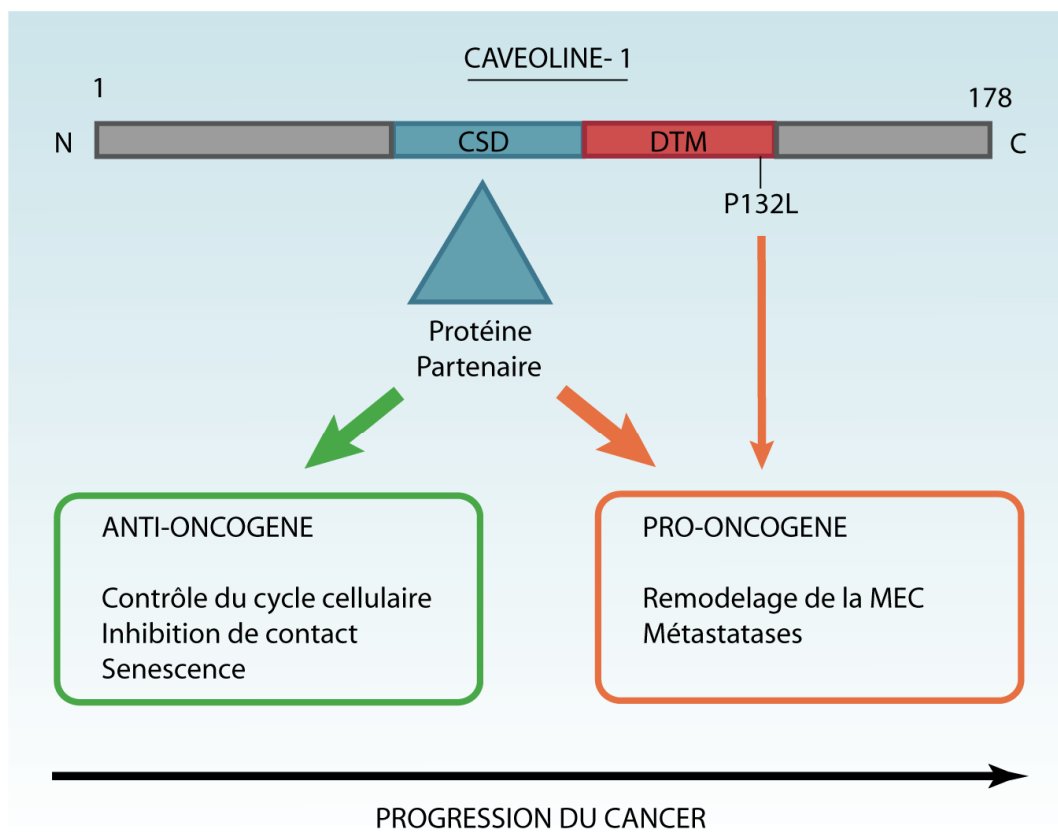


Figure 19 : Rôles de cavéoline-1 dans la progression des cancers

Dans les tissus sains, le domaine *scaffolding* de cavéoline-1 (CSD) interagit avec des protéines partenaires permettant le maintien de l'homéostasie normale des tissus. Au cours de l'oncogenèse, ces partenaires suppresseurs de tumeurs sont perdus au profit de partenaires pro-oncogènes. Une mutation sur le domaine transmembranaire (DTM) de cavéoline-1 provoquant un défaut de localisation a été détectée dans des tumeurs mammaires chez l'homme. D'après (Burgermeister et al., 2008).

3.1.1. Rôle de *CAVI* comme suppresseur de tumeur

Cavéoline-1 a été initialement identifiée comme une cible majeure, phosphorylée sur tyrosine, durant la transformation cellulaire induite par le RSV (Rous Sarcoma Virus) (Glenney, Jr., 1989). Ceci a conduit à suggérer un rôle de cette protéine dans l'oncogénèse. Cavéoline-1 est très fortement exprimée dans les cellules hautement différenciées telles que les adipocytes, les pneumocytes, les chondrocytes et les cellules musculaires lisses (Campbell et al., 1999; Hagiwara et al., 2002; Kandrór et al., 1995; Schwab et al., 1999). En accord avec un rôle antiprolifératif, l'expression de cavéoline-1 augmente au cours de la différenciation.

La preuve d'une relation inverse entre l'expression de cavéoline-1 et la transformation des cellules a été apportée dès 1995. En effet, la transformation des cellules NIH-3T3 par les oncogènes Abl et Ras induit une diminution de l'expression de cavéoline-1 (Koleske et al., 1995). A l'inverse, la restauration de l'expression de cavéoline-1 dans ces mêmes cellules suffit à rétablir l'inhibition de contact (Engelman et al., 1997). L'effet suppresseur de tumeur de cavéoline-1 a par la suite été confirmé dans les cellules de cancer du sein (Fiucci et al., 2002; Lee et al., 1998), et dans des cultures primaires de cellules épithéliales pulmonaires (Campbell et al., 1999).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'effet anti-oncogène de cavéoline-1 reposent sur le contrôle du cycle cellulaire et des mécanismes de sénescence. Premièrement, cavéoline-1 régule négativement la progression du cycle cellulaire (Galbiati et al., 2001c). En effet, la transcription de la cycline D1, protéine induite par les signaux mitogéniques, est réprimée de manière indirecte par cavéoline-1 (Hulit et al., 2000). D'autre part, l'expression de cavéoline-1 est induite lors d'un stress oxydatif, et sa surexpression suffit à induire la sénescence cellulaire (Dasari et al., 2006; Volonte et al., 2002), premier mécanisme de lutte contre la transformation cellulaire. A l'inverse, les fibroblastes déficients en cavéoline-1 sont résistants à la sénescence induite par un stress oxydatif (Volonte et al., 2002). Cependant, dans le contexte du cancer, l'accumulation de cellules sénescents peut avoir des effets pro-oncogènes. En effet, les cellules sénescents sécrètent des métalloprotéinases, des facteurs de croissance et des cytokines qui favorisent la croissance cellulaire et le potentiel métastatique des cellules tumorales (Bartholomew et al., 2009).

Chez l'homme, les gènes codant pour cavéoline-1 et -2 (*CAVI*) sont situés sur un locus fréquemment muté dans les cancers du sein, de la prostate ou les cancers colorectaux. Sur la base de cette observation, *CAVI* a été proposé comme un gène suppresseur de tumeur

chez l'homme (Engelman et al., 1998). Lors d'une étude menée sur 92 patientes, une mutation P132L a été détectée dans 16% des cancers du sein (Hayashi et al., 2001). *In vitro*, ce mutant est retenu dans l'appareil de Golgi et agit de manière dominante négative. Sur une autre cohorte de patientes, le groupe de M.P. Lisanti a confirmé la présence de cette mutation dans 19% des cancers du sein, et a identifié 6 nouvelles mutations sur *CAVI* (Li et al., 2006). Toutefois, une étude récente menée sur une importante cohorte n'a pas permis de détecter de mutation sur *CAVI* dans ce type de cancer (Patani et al., 2011), suggérant que ces mutations sont finalement moins fréquentes qu'estimé auparavant. Dans de rares cas, la perte d'expression de cavéoline-1 peut également être liée à une hyperméthylation de son promoteur (Cui et al., 2001; Kunze et al., 2006). L'absence de cavéoline-1, consécutive à des mutations fonctionnelles ou à une régulation négative de son expression, pourrait donc contribuer à l'apparition de cancers chez l'homme.

3.1.2. Rôle pro-oncogène de cavéoline-1

Bien que le rôle inhibiteur de cavéoline-1 dans la transformation cellulaire ait été clairement démontré *in vitro* et *in vivo*, sa fonction de gène suppresseur de tumeur a été remise en cause. En effet, des analyses effectuées sur des tumeurs du pancréas (Suzuoki et al., 2002), de l'œsophage (Ando et al., 2007), de la prostate (Satoh et al., 2003) et du poumon (Moon et al., 2005) ont révélé qu'une expression accrue de cavéoline-1 est corrélée à un mauvais pronostic vital.

L'idée que le rôle de cavéoline-1 diffère selon le stade de la tumeur permet de concilier ces données contradictoires. Plusieurs études ont montré que la surexpression de cavéoline-1 est corrélée à un accroissement du potentiel métastatique des cellules (Shatz and Liscovitch, 2008). En effet, une étude récente a démontré que cavéoline-1 favorise l'invasion tumorale et les métastases en induisant un remodelage de la matrice extracellulaire (Goetz et al., 2011).

Le modèle couramment admis propose que durant les premières étapes de la tumorigénèse, la transformation des cellules par des oncogènes induit une diminution de l'expression de cavéoline-1. Ceci permet ainsi une prolifération rapide due à la perte d'inhibition des signaux mitogéniques. La progression du cancer au stade métastatique repose sur d'autres changements génétiques permettant aux cellules d'acquérir un potentiel de migration. A ce stade, une forte expression de cavéoline-1 contribue à l'apparition de

métastases, associées à un mauvais pronostic vital. Le rôle complexe de cavéoline-1 dans la progression des cancers résulterait de ses fonctions multiples et de ses nombreuses interactions avec les protéines de signalisation qui modulent le comportement des cellules cancéreuses (Ravid et al., 2005) (**figure 19**).

3.1.3. Cavines et cancer

Le lien entre les cavine-2 et cavine-3 et l'apparition de cancers a été établi au début des années 2000, bien avant que leur fonction au sein des cavéoles n'ait été mise en évidence.

Des mutations sur le gène codant pour cavine-3 ont été détectées dans quelques lignées cancéreuses humaines, mais plus généralement, l'expression de cette protéine est diminuée dans les lignées de cancer du sein, des ovaires et des poumons (Xu et al., 2001). Ces données ont par la suite été confirmées chez l'homme dans les cas de cancer du poumon et des ovaires. Dans une majorité de cas, la diminution de l'expression de cavine-3 est due à une hyperméthylation du promoteur (Tong et al., 2010; Zochbauer-Muller et al., 2005).

Une analyse de l'expression des gènes dérégulés dans une lignée de cellules cancéreuses de prostate humaine (lignée PC-3) par «*microarrays*» a révélé que l'expression des cavines -2 et -3 est régulée négativement lors de l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire (Tenta et al., 2007). Chez l'homme, l'expression de cavine-2 est inhibée dans les tumeurs mammaires, rénales et de la prostate (Bai et al., 2011b; Li et al., 2008).

L'étude de cavine-1 dans le contexte du cancer a fait suite à son implication dans la formation des cavéoles. Les données ont mis en évidence un rôle de suppresseur de tumeur. En effet, l'expression de cavine-1 est réduite dans les tumeurs de la prostate (Gould et al., 2010) et dans les tumeurs mammaires (Bai et al., 2011b). Dans ce dernier cas, la perte d'expression de cavine-1 a été reliée à une hyperméthylation du promoteur.

A l'inverse de cavéoline-1, l'expression de chacune des cavines réduit le potentiel de migration des cellules en inhibant l'expression de la MMP9 (*matrix metalloproteinase 9*), une enzyme responsable de la dégradation de la matrice extracellulaire (Aung et al., 2011). Cet effet est conservé en l'absence de cavéoline-1 et est donc indépendant de la formation des cavéoles. De plus, cavine-1 semble également jouer son rôle de suppresseur de tumeur en favorisant la sénescence cellulaire. En effet, son expression est augmentée dans les fibroblastes humains sénescents, et sa surexpression suffit à induire la sénescence cellulaire

(Bai et al., 2011a). Cependant, cette étude ne permet pas d'exclure que cet effet soit secondaire à une augmentation de l'expression de cavéoline-1 en présence de cavine-1.

Compte-tenu des rôles multiples des protéines cavéolaires dans les processus de transformation cellulaire et dans la phase métastatique des cancers, il existe une corrélation variable de l'expression de cavéoline-1 avec le pronostic de survie suivant le type de cancer. Les protéines cavéolaires ne semblent donc pas être de bonnes cibles thérapeutiques pour le traitement des cancers. En effet, même si l'expression cavéoline-1 et des cavines permet de limiter la transformation des cellules, cibler ces protéines pour un traitement anticancéreux pourrait favoriser l'apparition de métastases.

3.2. Les dystrophies musculaires

Les dystrophies musculaires constituent un groupe de myopathies héréditaires caractérisées par une dégénération musculaire progressive et le remplacement du muscle par du tissu conjonctif. Ces pathologies présentent une très grande variabilité clinique quant à l'âge d'apparition, au type de muscle impliqué, à la progression de la maladie et au mode de transmission.

Dans le muscle squelettique, la colocalisation de cavéoline-3 avec la dystrophine (Song et al., 1996), protéine impliquée dans la myopathie de Duchenne, a conduit à rechercher des mutations sur le gène de cavéoline-3 (CAV3) dans plusieurs pathologies musculaires chez l'homme. Cette première étude a permis de mettre en évidence une mutation sur le gène de la cavéoline-3 chez 8 patients atteints d'une myopathie des ceintures (Minetti et al., 1998). Suite à cette découverte, deux équipes ont généré des souris déficientes pour le gène de la cavéoline-3 (Galbiati et al., 2001a; Hagiwara et al., 2000). Ces modèles animaux ont contribué à élucider les mécanismes moléculaires conduisant aux différentes pathologies musculaires en l'absence de cavéoline-3.

3.2.1. La myopathie de Duchenne

La myopathie de Duchenne est le type le plus commun et le plus sévère de dystrophie musculaire. Il s'agit d'une pathologie récessive liée au chromosome X, sur lequel de nombreuses mutations sur le gène de la dystrophine ont été découvertes. La dystrophine est exprimée majoritairement dans le muscle squelettique, le myocarde et le muscle lisse, et forme un complexe dystrophine-glycoprotéines avec les dystroglycanes et les sarcoglycanes. Ce large complexe possède à la fois un rôle de stabilisation mécanique et de signalisation puisqu'il permet les interactions entre le cytosquelette, la membrane plasmique et la matrice extracellulaire. Son absence induit une fragilité membranaire, avec pour conséquence une nécrose des myofibrilles et une perte des fibres musculaires qui sont alors remplacées par du tissu conjonctif.

Chez les patients atteints de la myopathie de Duchenne, les biopsies musculaires montrent une expression accrue de cavéoline-3 et des cavéoles plus larges et plus nombreuses (Bonilla et al., 1981; Repetto et al., 1999). Des expériences de co-immunoprécipitation et des

marquages immunofluorescents ont montré que cavéoline-3 colocalise avec le complexe dystrophine/glycoprotéines dans les myocytes (Song et al., 1996) (**figure 20**). Comme la dystrophine, cavéoline-3 interagit avec les β -dystroglycanes *via* leur motif PPxY, ce qui suggère une compétition entre ces deux protéines pour la liaison aux β -dystroglycanes (Sotgia et al., 2000). Cependant, les mécanismes conduisant à une surexpression de cavéoline-3 en l'absence de dystrophine ne sont pas connus.

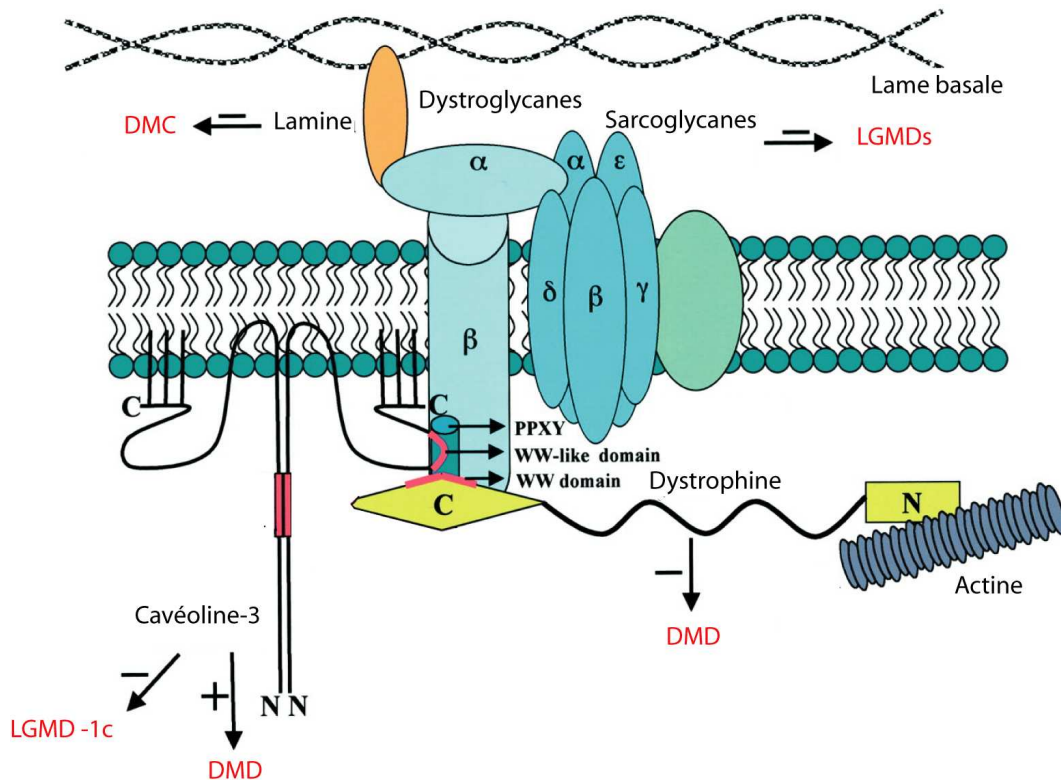


Figure 20 : Interaction de cavéoline-3 avec le complexe dystrophine-glycoprotéine dans les cellules musculaires

Le complexe dystrophine-glycoprotéine permet de relier la matrice extracellulaire au cytosquelette d'actine. La dystrophine et la cavéoline-3 possèdent un domaine WW ou WW-like permettant leur interaction avec les β -dystroglycanes. Les flèches indiquent les maladies causées par l'absence (-) ou la surexpression (+) des protéines du complexe. DMD, dystrophie musculaire de Duchenne ; LGMD, *limb-girdle muscular dystrophy* ; DMC, dystrophie musculaire congénitale. D'après (Galbiati et al., 2001b).

3.2.2. Les cavéolinopathies

Les pathologies musculaires liées à des mutations sur le gène de la cavéoline-3 ont été regroupées sous le terme de cavéolinopathies. Les cavéolinopathies rassemblent 5 phénotypes différents qui peuvent être présents chez les membres d'une même famille. En effet, il n'y a pas de corrélation entre le génotype et le phénotype dans ces pathologies, puisque la même mutation peut conduire à des signes cliniques différents. Les pathologies associées à ces

mutations sont la dystrophie des ceintures de type 1C (LGMD-1C pour *Limb-Girdle Muscle Dystrophy*), la maladie des muscle ondulants (RMD pour *Rippling Muscle Disease*), l'élévation asymptomatique des taux de créatinine kinase, et plus rarement la myopathie distale et l'hypertrophie cardiaque.

La LGMD-1C se caractérise par une apparition dans la première décennie d'une faiblesse modérée des muscles proximaux, associée à des crampes musculaires. Une analyse menée en 2008 sur un large échantillon de patients diagnostiqués pour une LGMD montre que *CAV3* est mutée dans 1,3 % des cas (Guglieri et al., 2008). Certaines de ces mutations conduisent à une diminution de 95 % de l'expression de cavéoline-3 (Minetti et al., 1998). Les études ultérieures ont révélé la variabilité des signes cliniques associés à ces mutations. En effet, la même mutation peut se traduire selon les patients par une élévation asymptomatique des taux de créatinine kinase (Carbone et al., 2000), une LGMD-1C ou encore une RMD, une maladie autosomique qui se caractérise par une hyper-sensibilité des muscles aux stimuli mécaniques (Betz et al., 2001).

Compte-tenu du rôle majeur de cavine-1 dans la formation des cavéoles, des mutations sur le gène codant pour cavine-1 ont été recherchées chez des patients atteints de dystrophies musculaires. Dans une première étude, deux mutations sur gène de cavine-1 ont été trouvées sur 5 patients présentant des dystrophies musculaires avec des symptômes variés (Hayashi et al., 2009). Peu après, ces mêmes mutations ont été mises en évidence chez 11 nouveaux patients présentant une hypertrophie des muscles lisses, une RMD, et de multiples anomalies du myocarde (Rajab et al., 2010). Par la suite, de nouvelles mutations sur cavine-1 ont été mises en évidences avec la même variabilité phénotypique que celle observée pour les mutations sur *CAV3* (Dwianingsih et al., 2010; Shastry et al., 2010). Il est important de noter que les patients mutés sur le gène codant pour cavine-1 présentent également un phénotype adipeux sévère, lié à l'absence de cavéoline-1 (cf. § 3.3).

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de dégénérescence musculaire observé chez les patients présentant une déficience primaire pour le gène de la cavéoline-3, ou secondaire consécutive à l'absence de cavine-1, sont multiples et partiellement caractérisés. Pour toutes les mutations identifiées, la présence de cavéoline-3 au niveau du sarcolemme est diminuée de manière drastique. Or les cavéoles sont essentielles dans le développement et le maintien de la structure membranaire du muscle squelettique. En effet, l'analyse par microscopie électronique d'échantillons musculaires de patients présentant

une LGMD-1C a révélé que l'absence de cavéoles au niveau du sarcolemme est associée à la formation de larges vacuoles sous la membrane (Minetti et al., 2002). Ces changements structuraux ont été également reportés chez des patients présentant une RMD. La diversité des phénotypes observés chez les patients portant une mutation sur CAV3 est probablement liée à la multiplicité des voies de signalisation régulées par cavéoline-3 dans le muscle.

3.3. Les lipodystrophies

Les lipodystrophies sont un groupe de maladies génétiques hétérogènes caractérisées par une lipoatrophie complète, qui affecte tous les dépôts adipeux, ou partielle qui conduit à une redistribution anormale du tissu adipeux. Afin d'identifier de nouvelles mutations, une des approches consiste à tester chez l'homme des gènes dont la délétion chez l'animal a pour conséquence un phénotype comparable. Cette stratégie a conduit à rechercher chez l'homme des mutations sur les gènes codant pour cavéoline-1 et pour les cavines.

La lipodystrophie généralisée, ou lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL), est une maladie autosomale récessive rare, caractérisée par l'absence quasi-totale de tissu adipeux, avec pour conséquence une résistance à l'insuline et une hypertriglycémie, et par une hypertrophie musculaire. Dans 95% des cas, le gène impliqué est celui codant pour l'AGPAT2 (1-acylglycérol-3-phosphate-O-acyltransférase), une enzyme catalysant la synthèse d'acide phosphatidique, un intermédiaire essentiel pour la synthèse des triglycérides et des phospholipides (Agarwal et al., 2002). Les autres gènes mutés chez ces patients codent pour la seipine (Magre et al., 2001), cavéoline-1 (Kim et al., 2008), ou cavine-1 (Hayashi et al., 2009). Une seule patiente atteinte de BSCL et homozygote pour une mutation non-sens sur *CAVI* a été identifiée à ce jour. Elle présente un phénotype similaire à celui décrit chez les patients mutés pour AGPAT2 ou la seipine. Les dépôts adipeux sous-cutanés et viscéraux sont quasi absents chez cette patiente, avec pour conséquence de très faibles taux circulants de leptine et d'adiponectine. Elle a également développé durant l'enfance une résistance à l'insuline sévère, un diabète et une hypertriglycémie. En revanche, malgré une absence de cavéoles dans tous les tissus non musculaires, cette patiente ne présente pas de défauts du système cardiovasculaire, ni de phénotype pulmonaire.

Les mutations hétérozygotes sur *CAVI* conduisent à un phénotype plus modéré puisque ces patients présentent une lipodystrophie partielle associée à une hypertriglycémie (Cao et al., 2008). La première patiente, porteuse d'une mutation non-sens produisant une protéine tronquée dans sa partie C-terminale, est dépourvue de tissu adipeux sous-cutané sur la partie supérieure du corps et le visage. Elle est résistante à l'insuline mais pas diabétique. Le second patient porte une mutation dans une région non transcrite en 5', avec un effet potentiel sur le cadre de lecture qui n'a pas été démontré. La lipoatrophie affecte uniquement les membres chez ce patient, mais il présente néanmoins une

résistance à l'insuline sévère et un diabète. Ces phénotypes très différents, et le faible nombre de patients ne permet pas de conclure quant aux conséquences fonctionnelles de mutations hétérozygotes sur *CAVI* chez l'homme.

La mise en évidence de deux mutations sur *CAVINE-1* associées à des phénotypes de lipodystrophie généralisée est venue confirmer l'implication des cavéoles dans ces pathologies chez l'homme (Hayashi et al., 2009). Ces protéines mutées ne sont plus localisées à la membrane plasmique et n'interagissent plus avec les cavéolines, ce qui conduit à une diminution drastique de l'expression de cavéoline-1 et du nombre de cavéoles. Le phénotype de lipodystrophie généralisée est donc probablement lié à la déficience secondaire en cavéoline-1 chez ces patients. Il s'accompagne d'une hyperinsulinémie modérée et d'une intolérance au glucose ou d'une hypertriglycémie suivant les patients. Ce phénotype métabolique modéré, un trait commun aux autres patients présentant des mutations sur le gène de *CAVINE-1* (Dwianingsih et al., 2010b; Rajab et al., 2010; Shastry et al., 2010), apparaît surprenant compte-tenu de la résistance à l'insuline sévère observée chez les souris *Cavine-1* (-/-).

L'ensemble de ces données illustre bien le rôle majeur de la cavéoline-1 et des cavéoles dans la fonction de stockage lipidique du TA chez l'homme. La forte expression de cavéoline-1 dans les adipocytes, sa localisation autour des gouttelettes lipidiques ainsi que l'implication des cavéolines dans le métabolisme lipidique en font de bons candidats pour le contrôle de la capacité de stockage lipidique des adipocytes. Cette idée est appuyée par les phénotypes adipeux associés à l'absence des protéines cavéolaires aussi bien dans les modèles de souris transgéniques que chez l'homme.

PRESENTATION DU TRAVAIL

Dans des conditions de surcharge nutritionnelle, comme c'est le cas au cours de l'obésité, le tissu adipeux ne parvient plus à stocker les acides gras excédentaires ce qui conduit à une accumulation ectopique de lipides dans d'autres tissus. Ces lipides sont à l'origine de phénomènes de lipotoxicité jouant un rôle déterminant dans l'apparition des complications métaboliques associées à l'obésité. Dans ce contexte, il apparaît important de comprendre les mécanismes moléculaires qui limitent la capacité de stockage maximale du tissu adipeux.

Plusieurs arguments suggèrent un rôle important des cavéolines dans la régulation et le maintien de l'intégrité structurale des gouttelettes lipidiques. L'invalidation du gène de la cavéoline-1 chez la souris conduit à la formation d'un tissu adipeux atrophié, composé d'adipocytes de petite taille. De plus, ces souris ne parviennent pas à adapter leur capacité de stockage lipidique lorsqu'elles sont soumises à un régime hyperlipidique (Razani et al., 2002a). Ce phénotype lipoatrophique est également présent chez les souris *Cavin1* (-/-), en lien avec la diminution drastique de l'expression de cavéoline-1 dans les adipocytes (Liu et al., 2008). L'identification d'une mutation nulle homozygote chez une patiente souffrant de lipodystrophie a révélé que la perte d'expression de cavéoline-1 se traduisait aussi chez l'homme par des défauts de stockage lipidique (Kim et al., 2008). Par ailleurs, la cavéoline-1 se redistribue autour des gouttelettes lipidiques dans des adipocytes en culture suite à l'addition de lipides exogènes (cholestérol, acides gras) (Le Lay et al., 2006; Pol et al., 2005), ainsi que dans des adipocytes matures (Blouin et al., 2008), selon un processus s'apparentant à l'endocytose cavéolaire. Enfin, l'absence de cavéoline-1 autour des gouttelettes lipidiques adipocytaires induit des changements de leur composition protéique et lipidique (notamment des phospholipides et du cholestérol) suggérant donc un rôle déterminant des cavéolines dans le remodelage de la monocouche phospholipidique de la gouttelette lipidique (Blouin et al., 2010; Le Lay et al., 2006). Ainsi, l'expansion de la gouttelette lipidique consécutive au stockage des lipides neutres nécessite un ajustement permanent du ratio volume/surface qui pourrait faire intervenir les protéines cavéolines.

Cavéoline-1 est une protéine très abondante dans le tissu adipeux, du fait de sa très forte expression à la fois adipocytaire et endothéliale. Outre le phénotype métabolique, les souris invalidées pour le gène *Cav1* présentent aussi des altérations du système vasculaire

liées à des défauts de perméabilité endothéliale (Schubert et al., 2002). La vascularisation revêt un caractère essentiel dans le contexte adipeux, lieu de stockage des réserves énergétiques sous forme de lipides. Ainsi, un défaut dans l'apport de nutriments *via* des altérations de la perméabilité endothéliale pourrait être à l'origine du phénotype lipoatrophique.

La première partie de mon travail de thèse vise à déterminer les rôles respectifs de la cavéoline-1 adipocytaire et endothéliale dans l'apparition du phénotype lipoatrophique observé chez les souris *Cav1* (-/-). Pour cela, nous avons mis à profit l'existence du modèle de souris *Cav1* RC, qui ré-exprime cavéoline-1 spécifiquement dans les cellules endothéliales sur un fond génétique *Cav1* (-/-) (Yu et al., 2006a). Nous montrons que ni le développement du tissu adipeux, ni la taille adipocytaire ou encore les défauts d'expression génique caractérisant le phénotype lipoatrophique des souris *Cav1* (-/-) ne sont restaurés chez les souris *Cav1* RC. L'observation d'un phénotype lipoatrophique persistant dans le modèle *Cav1* RC nous a permis d'établir le rôle majeur de la cavéoline-1 adipocytaire dans le développement de ce phénotype adipeux. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une infiltration accrue de macrophages non inflammatoires dans le tissu adipeux des souris *Cav1* (-/-), corrigée par la réexpression endothéliale de cavéoline-1. Ces données ont révélé l'implication de la cavéoline-1 endothéliale dans la régulation de l'infiltration macrophagique du tissu adipeux. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication :

**« Distinct roles of endothelial and adipocyte caveolin-1
in macrophage infiltration and adipose tissue metabolic activity »**

Nolwenn Briand, Soazig Le Lay, William C. Sessa, Pascal Ferré, Isabelle Dugail.

Diabetes. 2011 Feb; 60(2):448-53

Si les approches de perte de fonction indiquent clairement que la présence de cavéoline-1 est nécessaire à un stockage lipidique correct, aucune étude n'a jusqu'à présent évalué l'effet d'approches de gain de fonction. On peut ainsi se demander si, à l'inverse des modèles de perte de fonction de cavéoline-1 qui entraînent une lipodystrophie, une surexpression de la cavéoline-1 permettrait d'augmenter la capacité de stockage lipidique et

d'obtenir des adipocytes « super-sized », permettant de limiter les phénomènes de lipotoxicité liées à l'accumulation ectopique d'acides gras vers d'autres tissus.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, j'ai ainsi mise en place une stratégie de gain de fonction par surexpression de cavéoline-1 et de ses protéines partenaires cavines dans les adipocytes. Pour ce faire, nous avons généré plusieurs lignées adipocytaires 3T3-L1 surexprimant stablement les protéines de fusion Cavéoline-1-RFP (Cav1 RFP), Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP. La surexpression de chacune de ces protéines conduit à une augmentation significative du nombre de cavéoles en lien avec une sensibilité à l'insuline accrue. Par contre, seule la surexpression de cavéoline-1 induit la formation de gouttelettes lipidiques de grande taille, suggérant que le rôle de cav1 dans le stockage serait indépendant des structures cavéolaires. Afin de confirmer ce résultat chez l'animal, nous avons recours à un modèle d'adipogenèse *in vivo* utilisant la propriété des lignées préadipocytaires à former un tissu adipeux *de novo* lorsqu'elles sont injectées à des souris Nude. Les tissus adipeux néoformés surexprimant Cav1 RFP présentent des adipocytes de plus grande taille que les tissus adipeux contrôles, confirmant le rôle critique de cavéoline-1 pour le stockage lipidique adipocytaire *in vivo*.

Dans un second temps, nous avons cherché à caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de cavéoline-1 sur l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques. Nous montrons que ni la lipogenèse, ni la lipolyse en réponse à une stimulation par un agoniste adrénergique ne sont modifiées dans les lignées surexprimant cavéoline-1 ou les cavines. Bien que le nombre de cavéoles à la membrane des adipocytes 3T3-L1 soit augmenté dans toutes les lignées surexprimantes (Cav1 RFP, Cavine-1 GFP ou Cavine-3 GFP), seule la surexpression de Cav1 RFP permet d'accroître la capacité de stockage lipidique adipocytaire. Cette observation suggère que l'effet de la surexpression de cavéoline-1 serait indépendant des structures cavéolaires. Les cavéolines se localisent en grande partie au niveau de la membrane plasmique, cependant, la gouttelette lipidique représente un pool non négligeable de cavéolines dans l'adipocyte. La surexpression d'une protéine de fusion Cav1-périlipine-GFP, permettant un adressage spécifique de cavéoline-1 aux gouttelettes lipidiques dans des adipocytes 3T3-L1, reproduit le phénotype de la lignée Cav1 RFP, c'est à dire l'apparition de gouttelettes de plus grande taille.

L'expansion des gouttelettes peut faire appel à quatre mécanismes : les processus de fusion dépendants des protéines SNAREs, partiellement démontrés, le transfert des lipides

neutres *via* des sites de contact générés par la protéine FSP27, la synthèse *in situ* des composants lipidiques de la GL et enfin les processus de coalescence consécutifs à une modification de la composition phospholipidique des GLs. Nous avons postulé que cavéoline-1 modulait la croissance des GLs en régulant une protéine partenaire impliquée dans un de ces quatre mécanismes. Nous avons sélectionné deux protéines candidates localisées à la surface des gouttelettes lipidiques, présentant de nombreuses séquences consensus de liaison à cavéoline-1 et impliquées dans la croissance *in situ* des gouttelettes lipidiques : la diacylglycérol acyltransférase 2 (DGAT2) et la lysophosphatidylcholine acyltransférase 3 (LPCAT3). L'activité des ces enzymes n'est pas modifiée lorsqu'elles sont co-exprimées avec cavéoline-1 dans les cellules COS7, dépourvues de cavéoles. La DGAT2 et la LPCAT3 ne semblent donc pas impliquées dans les effets de cavéoline-1 sur la croissance des gouttelettes lipidiques.

La localisation des cavéolines dans l'adipocyte n'est bien évidemment pas restreinte aux GLs. En effet, les cavéolines sont présentes au niveau de la membrane plasmique où elles organisent les structures cavéolaires, ainsi que dans des pools intracellulaires (notamment dans l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique) qui constituent les lieux de synthèse et d'organisation des oligomères de cavéolines. Cette large distribution des cavéolines sous-entend des rôles possiblement divers, notamment dans la modulation de voies de signalisation dans laquelle les cavéoles ont été formellement impliquées.

J'ai ainsi contribué à une étude visant à étudier de manière globale les conséquences de l'absence de cavéoline-1 sur le métabolisme adipocytaire. L'absence de cavéoline-1 dans les adipocytes entraîne de nombreux défauts d'expression protéique, pas seulement restreints au récepteur à l'insuline, mais pour la plupart liés à une dégradation protéique accrue indépendante du protéasome. En accord, nous montrons une induction du processus d'autophagie en absence de cavéoline-1, révélé par la présence spécifique d'un marqueur des autophagosomes (LC3-II) dans des adipocytes déficients pour la cavéoline-1 ainsi que la présence de nombreux autophagosomes dans le tissu adipeux de souris *Cav1* (-/-) . En absence de cavéoline, la signalisation insulinique ainsi que la réponse lipolytique (induite normalement en cas de privation énergétique) sont altérées. L'adipocyte, incapable de pourvoir à ses besoins énergétiques, pourrait ainsi déclencher un processus autophagique lui permettant de contrecarrer cette privation énergétique et qui pourrait ainsi participer à l'établissement du phénotype lipoatrophique. Ces résultats ont fait l'objet d'un article en second auteur dans le journal *Autophagy*, présenté en annexe I.

Les cavéolines ont longtemps été considérées comme nécessaires et suffisante pour la formation des cavéoles. Depuis 2008, les découvertes successives des protéines de la famille cavine ont permis d'avancer dans la compréhension de la structure et des fonctions des invaginations cavéolaires. Ces nouvelles données ont fait l'objet d'une revue à laquelle j'ai contribué, présentée en annexe II.

RESULTATS EXPERIMENTAUX I

ROLES DISTINCTS DE LA CAVEOLINE-1 DANS LES DIFFERENTS TYPES CELLULAIRES QUI COMPOSENT LE TISSU ADIPEUX

ARTICLE 1

« Distinct roles of endothelial and adipocyte caveolin-1 in macrophage infiltration and adipose tissue metabolic activity »

Nolwenn Briand, Soazig Le Lay, William C. Sessa, Pascal Ferré, Isabelle Dugail

Diabetes. 2011 Feb; 60(2):448-53

BUT DU TRAVAIL

Le défaut d'expression de cavéoline-1 conduit à un phénotype lipoatrophique sévère, tant dans le modèle murin des souris *Cav1* (-/-) que chez l'homme. Compte-tenu de la très forte expression de cavéoline-1 dans les adipocytes et les cellules endothéliales, nous avons voulu établir la contribution relative de ces deux types cellulaires dans l'établissement du phénotype adipeux des souris *cav1* (-/-). Pour cela, nous avons mis à profit l'existence du modèle murin *Cav1* RC (*caveolin-1 reconstituted*) qui réexprime la cavéoline-1 spécifiquement au niveau de l'endothélium sur un fond génétique *Cav1* (-/-). Nous avons donc comparé le développement du tissu adipeux et le profil métabolique de souris contrôles, *Cav1* (-/-) et *Cav1* RC.

RESULTATS

La lipoatrophie des souris *Cav-1* (-/-) se caractérise par une diminution des poids de tissus adipeux inguinaux et péri-génitaux accompagnée d'une réduction drastique du diamètre adipocytaire mesuré sur des préparations d'adipocytes isolés. Malgré ces défauts de stockage, la morphologie et le développement du tissu adipeux apparaissent normales. Ces paramètres conservés chez les souris *Cav1* RC sont le signe d'un phénotype lipoatrophique persistant malgré la réexpression endothéliale de cavéoline-1. De plus, l'analyse globale de l'expression génique des adipocytes *Cav1* RC et contrôles par « *microarrays* » révèle une diminution de l'expression des gènes liés aux processus métaboliques en général, plus particulièrement au métabolisme des lipides. L'ensemble de ces données nous permet de conclure que le défaut de stockage lipidique observé chez les animaux déficients pour le gène de la cavéoline-1 résulte de l'absence de cavéoline-1 au niveau des adipocytes.

Cette étude nous a également permis de mettre en évidence un rôle de la cavéoline-1 endothéliale dans l'infiltration macrophagique du tissu adipeux. En effet, un marquage fluorescent des noyaux au DAPI, et des adipocytes avec un anticorps dirigé contre la périlipine-1, révèle un ratio noyaux/adipocytes augmenté dans le tissu adipeux des souris *Cav1* (-/-). Cela signifie que le tissu adipeux de ces animaux est enrichi en cellules non adipocytaires. Compte-tenu des données de la littérature qui décrivent une infiltration de macrophages dans le tissu adipeux des patients obèses mais aussi lipoatrophiques, nous avons voulu tester la présence de macrophages dans le tissu adipeux de ces souris. Des marquages immunohistochimiques réalisés à l'aide de marqueurs comme Mac2 et F4/80, protéines exprimées par les macrophages murins, ont confirmé la présence de macrophages dans le tissu adipeux des souris *Cav1* (-/-). De plus, l'analyse par RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) quantitative des gènes spécifiques de l'état M1 (TNF α , IL-6, MCP1) ou M2 (Mgl1, Mrc2, Arginase 1) des macrophages ont montré le caractère non-inflammatoire de ces macrophages infiltrés. La réexpression de cavéoline spécifiquement au niveau de l'endothélium (souris *Cav1* RC) normalise cette infiltration macrophagique suggérant un rôle critique de l'expression endothéliale de cavéoline-1 dans le contrôle de la perméabilité vasculaire vis-à-vis des macrophages.

Distinct Roles of Endothelial and Adipocyte Caveolin-1 in Macrophage Infiltration and Adipose Tissue Metabolic Activity

Nolwenn Briand,¹ Soazig Le Lay,¹ William C. Sessa,² Pascal Ferré,¹ and Isabelle Dugail¹

OBJECTIVE—Defective caveolin-1 expression is now recognized as a cause of lipotrophic diabetes in patients, due to primary caveolin gene mutations or secondary caveolin deficiency caused by *PTRF/cavin* gene defects. The goal of this study was to establish the relative contribution of endothelial cells and adipocytes, both highly expressing caveolin-1 to the lipotrophic phenotype of mice with global *caveolin-1* gene invalidation (Cav1-KO).

RESEARCH DESIGN AND METHODS—We compared adipose tissue development and metabolic phenotype of wild-type (WT), lipotrophic Cav1-KO, and a murine model with specific rescue of caveolin-1 expression in endothelial cells (caveolin-1-reconstituted [Cav1-RC]).

RESULTS—Defective adipose tissue development, reduced adipocyte size, and global alteration in adipose tissue gene expression that characterize lipotrophic caveolin-1 null mice were still observed in Cav1-RC, indicating a prominent role of adipocyte-derived caveolin in lipotrophy. We also observed that Cav1-KO adipose tissue contained an increased proportion of infiltrated macrophages compared with control mice, mostly with an alternate activation M2 phenotype. In contrast with defective lipid storage and lipotrophy, macrophage infiltration was normalized in Cav1-RC mice, pointing to caveolin-1-dependent endothelium permeability as the causing factor for adipose tissue macrophage infiltration in this model.

CONCLUSIONS—This is the first report of a specific role for adipocyte caveolin expression in lipid storage. Our study also shows that endothelium caveolin critically participates in the control of macrophage extravasation from the blood into adipose tissue, therefore establishing distinct roles depending on topology of caveolin expression in different cell types of adipose tissue. *Diabetes* 60:448–453, 2011

Lipotrophic diabetes is primarily a result of defective adipose tissue lipid storage resulting in severe dyslipidemia and insulin resistance. Multiple alterations can cause lipotrophic diabetes, and rare single gene defects have been identified in patients (1). The recent discovery of mutations in the human *caveolin-1* gene in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy, and mutations in polymerase I and transcript release factor (*PTRF*)/cavin causing secondary deficiency

of caveolins and generalized lipodystrophy, brings into focus caveolin proteins in the pathogenesis of lipotrophic diabetes in humans (2,3).

Caveolins form a conserved family of membrane-associated proteins generated from three genes with tissue-specific expression. Caveolin-1 and -2 are coexpressed and mostly abundant in endothelial cells, adipocytes, and type II pneumocytes, whereas caveolin-3 is restricted to muscle. A striking trait of caveolins is to induce the formation of caveolae, small (50–100 nm) invaginated pits on the cell surface. Caveolae represent well-defined membrane subdomains with specific lipid composition closely related to lipid rafts, coated with oligomerized caveolins on their cytoplasmic face (4). It is no longer accepted that caveolins are the only specific proteins required for caveolae formation since an additional group of structurally related proteins, called cavins, was recently identified (5–7). Despite this recent progress, precise roles of caveolae still remain unclear. Furthermore, it is not well established whether caveolins can exert functions outside of caveolae.

Murine models with targeted gene invalidation for *caveolin-1* and *PTRF/cavin* are available, and almost recapitulate the human phenotype, developing a lipotrophic syndrome with only residual fat at higher ages, hyperlipidemia, and glucose intolerance (6,8). However, phenotypic alterations in caveolin-1 null mice appear more severe than that observed in patients, since they include additional vascular abnormalities. Exaggerated vascular relaxation, related to increased endothelial nitric oxide synthase activity, that deteriorates toward pulmonary dysfunction and cardiac hypertrophy has been described in caveolin-1 null mice (9,10). Noteworthy, all these alterations are rescued by cell-specific re-expression of caveolin-1 in endothelium, underlying a prominent role for this protein in the physiology of endothelial cells (11).

The question of whether lipotrophy could be related to disrupted endothelial and/or adipocyte caveolin expression is presently unanswered. Adipocytes as well as endothelial cells highly express caveolin-1, and a close interconnection with vascular network is of crucial importance for adipose tissue metabolic function, particularly nutrient storage. In this study, we took advantage of a murine model with tissue-specific caveolin deficiency to dissect the roles of caveolin in fat and endothelium and their respective contribution to the lipotrophic phenotype seen in the total absence of caveolin.

We show that a lack of caveolin in adipocytes but not in endothelial cells accounts for lipotrophy. Interestingly, we also observed that endothelial caveolin regulate macrophage infiltration and extravasation of immune cells into adipose tissue, thus unraveling distinct roles of endothelial and adipocyte caveolins.

From the ¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, U872, Paris, France; and the ²Department of Pharmacology and Vascular Biology and Therapeutics Program, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut. Corresponding author: Isabelle Dugail, isabelle.dugail@crc.jussieu.fr. Received 21 June 2010 and accepted 22 November 2010. DOI: 10.2337/db10-0856

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db10-0856/-/DC1>.

© 2011 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animal studies were conducted according to French guidelines. Caveolin-1 reconstituted (Cav1-RC) mice (11) were generated on the caveolin-1 KO genetic background (10). Mice were killed at 6 months of age by cervical dislocation. Serum cytokines and insulin were measured using a multiplex kit (Millipore).

Adipose tissues were processed for immunohistochemistry as described (12). For immunohistochemistry, adipose tissue sections were incubated in antigen retrieval solution (Dako) and perlipin antibody (Progen) in PBS 2% FCS and 1% BSA. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-coupled guinea pig antibody (Jackson ImmunoResearch) was used, and slides were mounted in Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Adipose and stroma-vascular fractions were isolated as described previously (13). Briefly, fat depots were digested in Krebs-Ringer bicarbonate (pH 7.4) containing 1% BSA and 1 mg/mL collagenase A (Roche). After filtration (180- μ m nylon mesh), adipocyte fraction was washed twice in DMEM (GIBCO, Invitrogen). Adipocyte diameters were measured using Perfect Image 6.10 (Clara Vision).

Total RNA was extracted from frozen adipose tissue by cesium chloride centrifugation and analyzed by real-time PCR using MyiQ real-time thermal cycler (Bio-Rad) with Mesa green qPCR kit (Eurogentec) as described previously (14). Melt curve analysis was conducted to check single products, and 18 S mRNA was used for normalization.

mRNA preparations (six mice/group) were used to obtain labeled cRNA and hybridized on Agilent microarrays at the Functional Genomics Center of Zurich (ETH, Zurich). Expression values were imported into GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies).

Results are presented as means \pm SE. The data were statistically analyzed by ANOVA or Student *t* test.

RESULTS

Caveolin rescue in endothelium does not reverse lipodystrophy. It is not known whether the lipodystrophic phenotype described in Cav1-KO mice (11), and also found

in human patients with caveolin deficiency (2,3), can be alleviated by endothelium caveolin re-expression. In murine adipose tissue extracts, caveolin is expressed in both mature adipocyte and endothelial containing stroma-vascular cell fractions, whereas it is found exclusively in the stroma-vascular fraction in endothelium-specific Cav1-RC mice (Fig. 1A). Caveolin-1 distribution in adipose tissue sections indicated Cav1 labeling of both blood vessel endothelium and surrounding adipocytes in wild-type (WT) mice and a complete absence of signal in Cav1-KO adipose tissue. As expected, Cav1 labeling was restricted to blood vessels and absent from adipocytes in Cav1-RC (Fig. 1B). Blood levels of glucose, insulin, and free fatty acids were not different between Cav1-KO and Cav1-RC mice (Fig. 1C), and the three groups of mice have comparable body weight at 6 months of age (data not shown). However, subcutaneous and perigenital fat in Cav1-KO and Cav1-RC is drastically decreased compared with controls, in both males and females (Fig. 2A). Poor adipose tissue development in Cav1-KO and Cav1-RC is associated with a decreased size of adipocytes on adipose tissue sections (Fig. 2B), confirmed by direct measurement of adipocyte diameters after collagenase digestion of fat pads (Fig. 2C). Thus persistent reduction of adipocyte fat storage in Cav1-RC and Cav1-KO mice compared with WT controls indicates that specific endothelium caveolin-1 rescue is ineffective to normalize adipose tissue growth.

Lipodystrophic phenotype in caveolin-1 null mice is therefore linked to specific failure within adipocytes. To further investigate adipocyte function, we assess global

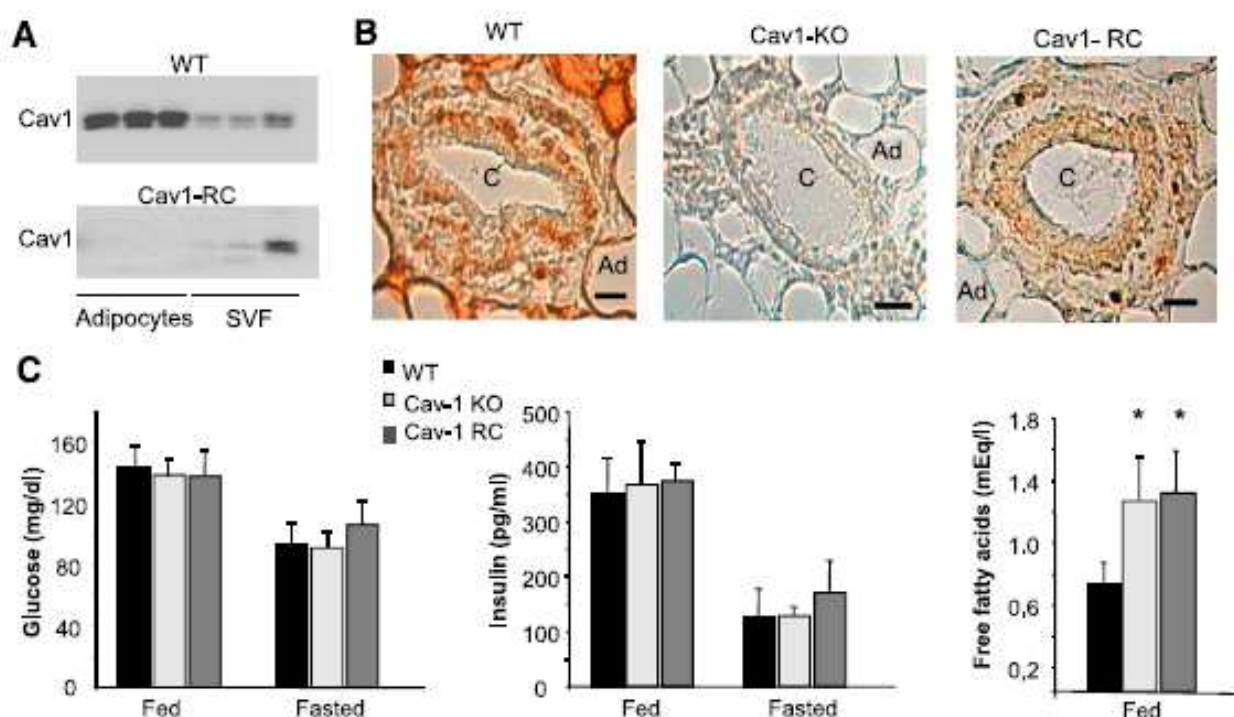


FIG. 1. Topology of caveolin-1 expression in WT mice, Cav1-KO, and Cav1-RC. **A:** Western blot analysis of caveolin-1 expression after collagenase digestion of adipose tissue and fractionation according to cell density. SVF and floating adipocytes were considered. Three independent cell preparations are shown, each obtained from adipose tissues of four pooled mice. Time exposure is different for WT (30 s) and Cav1-RC samples (5 min). Incomplete recovery of Cav1 expression in Cav1-RC SVF is likely because of the fact that in WT SVF, Cav1 expression is not restricted to endothelial cells (macrophages, fibroblasts). **B:** Immunostaining of subcutaneous inguinal adipose tissue. Caveolin-1 labeling was revealed with a polyclonal antibody (BD Transduction Laboratories). Scale bar is 20 μ m. C, capillary lumen; Ad, adipocyte. **C:** Glycemia, insulinemia, and free fatty acids levels were assessed in the postabsorptive state (fed) or after an overnight fast in 6-month-old mice. In each group, 5–9 mice were measured. (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

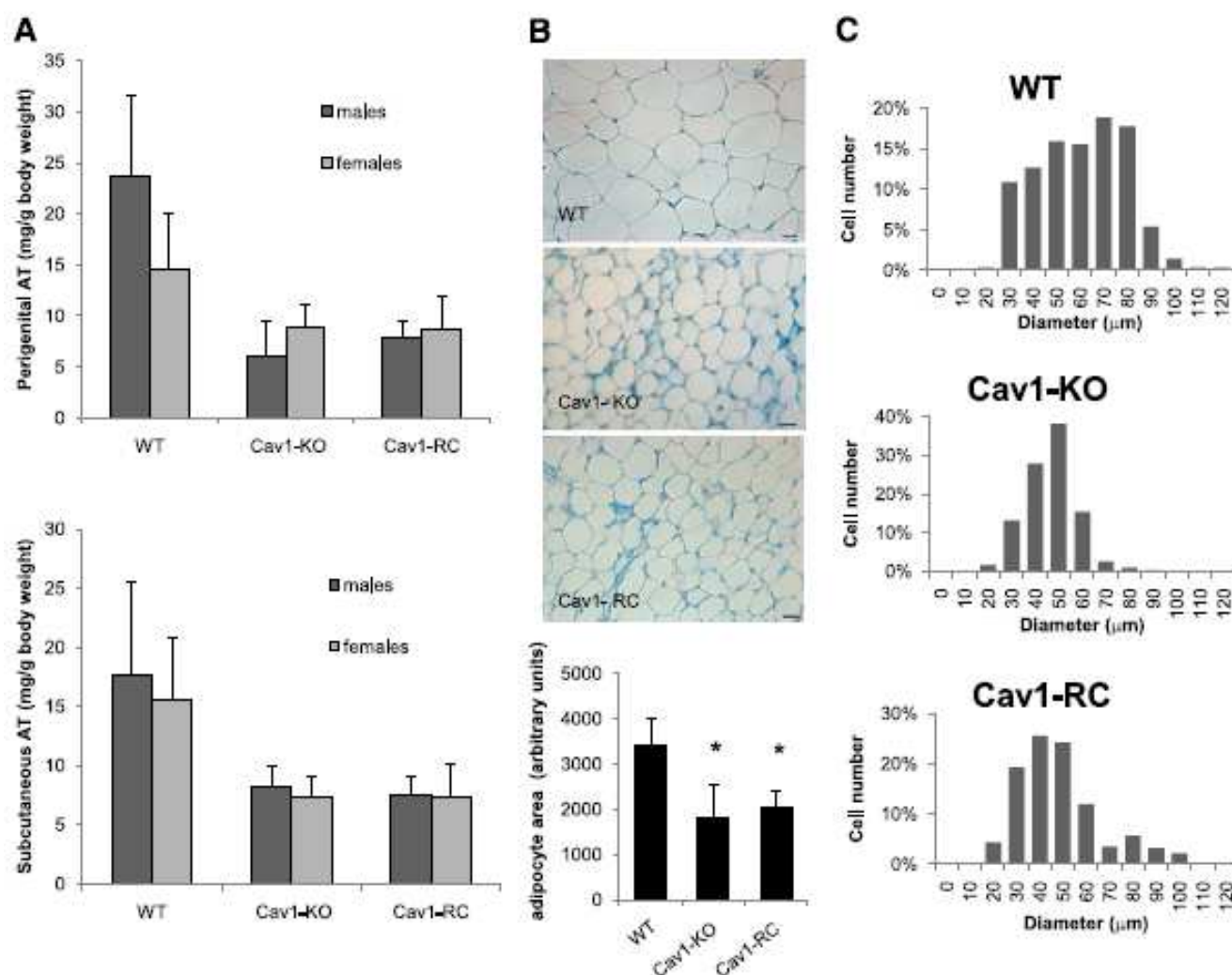


FIG. 2. Persistence of lipotrophic phenotype in Cav1-RC mice. **A:** Adipose tissue weights in perigenital (*top*) and subcutaneous (*bottom*) locations in 6-month-old male and female mice. Bars represent mean values \pm SE, with at least eight individual mice in each group. WT mice were significantly different from other groups by ANOVA, $P < 0.01$. **B:** Hemalun staining of subcutaneous adipose tissue sections from sex-matched 6-month-old mice. Scale bar is 20 μ m. Adipocyte area quantification was performed using ImageJ software. Values are means \pm SE obtained from at least five different mice in each group. *Indicates a significant difference ($P < 0.05$) vs. WT by Student *t* test. **C:** Measurements of isolated adipocyte diameters from sex-matched 6-month-old mice. The size of at least 200 individual adipocytes was determined from scaled images using Perfect Image 6.10 (Clara Vision software). Each plot represents a distribution of an individual adipocyte population in diameter classes. Each distribution was obtained from pooled perigenital adipose tissues of three mice in each group. (A high-quality color representation of this figure is available in the online issue.)

changes in gene expression by microarray experiments on epididymal adipose tissue of Cav1-RC and WT mice. Classification of differentially expressed genes was based on gene ontology (GO) annotation using FunNet software (15). Relevant biological themes, annotating differentially expressed genes, are indicated by significantly overrepresented categories from the GO Biological Process ontologies (Supplementary Fig. 1 and Supplementary Table 1). The genes upregulated in Cav1-RC adipose tissue were annotated mainly by functional themes associated with the cellular membrane and cell signaling (cell surface linked receptor signal transduction, cell adhesion). Not surprisingly, these pathways connect to a well-established role of caveolin as a general suppressor of signal transduction. More interestingly, downregulated genes were annotated mostly by themes related to intracellular metabolism such as transport, metabolic process, generation of precursor

metabolites and energy, and carbohydrate and lipid metabolic process. Thus caveolin absence in adipocytes is shown here to profoundly affect gene expression toward reduced metabolic activity, which fits with the persistence of lipotrophic phenotype in Cav1-RC mice.

Endothelium caveolin deficiency promotes infiltration of noninflammatory M2 macrophages in adipose tissue. Careful inspection of histological images revealed that additional changes in cellular composition of the adipose tissue were also present in these mice. DAPI and perilipin staining indicated increased nuclei-to-adipocytes ratio specifically in totally deficient animals (Cav1-KO) and not in Cav1-RC or WT (Fig. 3A). Because macrophage infiltration in adipose tissue is now well-established as a process related to changes in fat mass (12,16), we sought to examine adipose tissue sections for macrophage markers. F4/80 or Mac2 labeling revealed few positive cells

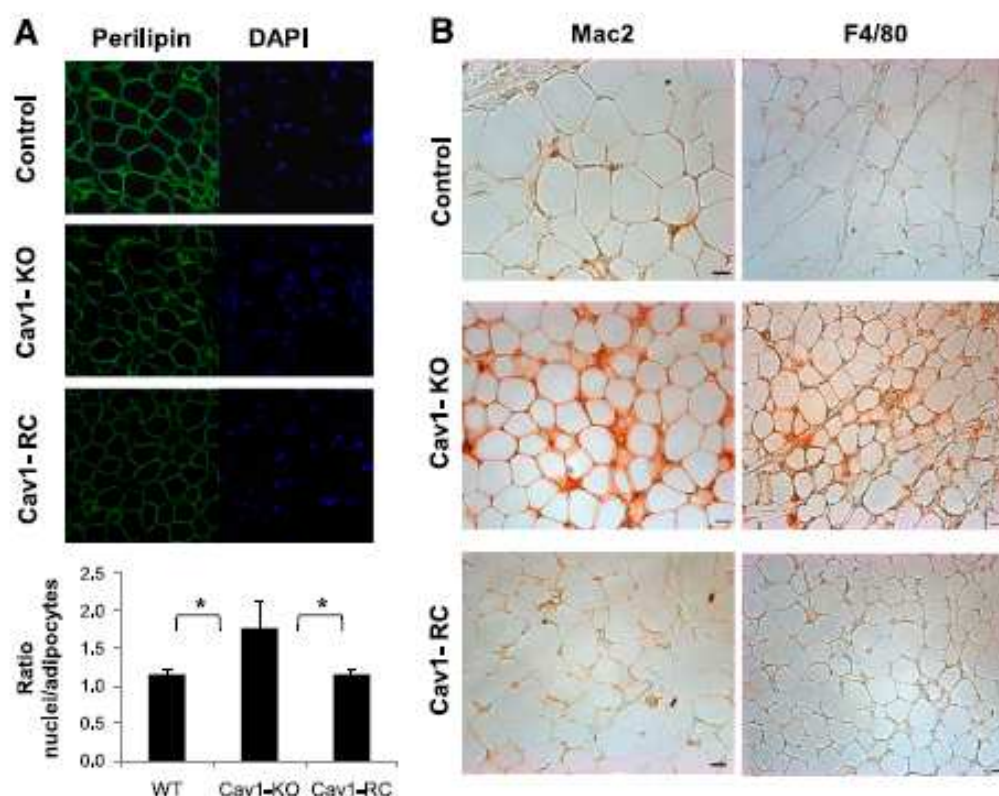


FIG. 3. Altered cellular composition of adipose tissue in Cav1-KO but not Cav1-RC mice. Inguinal adipose tissue sections of WT mice, Cav1-KO, and Cav1-RC (at least five mice/group) were labeled for nuclei with DAPI and for lipid droplet-associated protein perilipin (A) or with macrophage surface markers (B). Ratios of DAPI positive nuclei to perilipin positive adipocytes are quantified. Significant differences by Student *t* test are noted (*). (A high-quality digital representation of this figure is available in the online issue.)

in WT, reflecting the presence of a small proportion of resident macrophages (Fig. 3B). F4/80 or Mac2 positive cells increased in Cav1-KO, indicating that caveolin-deficient adipose tissue was infiltrated by macrophages. On the contrary, specific endothelium caveolin re-expression in adipose tissue limited macrophage presence with identical F4/80 or Mac2 staining between Cav1-RC and WT (Fig. 3B). Therefore, these data suggest a critical role for endothelial caveolin-1 in the control of adipose tissue macrophage infiltration.

We also compared gene expression of macrophage markers in adipose tissue of the three mice strains. *Emr1* (F4/80) and *cd68* expression increased threefold in Cav1-KO adipose tissue in comparison with WT (Fig. 4A). Both *Emr1* and *cd68* mRNA expression are normalized in Cav1-RC. All together, mRNA expression and immunostaining confirm the increased presence of macrophages in adipose tissue of Cav1-KO mice, which can be reversed by specific re-expression of caveolin-1 in endothelial cells.

Adipose tissue is normally hosting a small number of resident macrophages, which display a reparative phenotype (M2 or alternative activation) (17), characterized by the expression of proteins implicated in tissue remodeling as arginase-1 (*Arg-1*), mannose receptor C type 2 (*Mrc-2*), or macrophage galactose *N*-acetyl-galactosamine-specific lectins (*Mgl-1*). Upon obesity, adipose tissue macrophage infiltration increases, and they switch to a proinflammatory phenotype (M1 or classical activation) leading to production of proinflammatory cytokines like monocyte

chemoattractant protein-1 (*Mcp-1*), tumor necrosis factor- α (*TNF- α*), or interleukin (*IL*)-6. Relative mRNA expression (Fig. 4B) and blood levels (Fig. 4C) of macrophage markers defining M1 and M2 states (Fig. 4E) indicated no change for M1 markers in WT, Cav1-KO, and Cav1-RC, whereas M2 markers were increased in Cav1-KO mice compared with WT and normalized by specific endothelial caveolin re-expression (Cav1-RC). A noticeable exception to this scheme is plasminogen activator inhibitor 1 (*PAI-1*) mRNA and blood levels (Fig. 4D), which remained elevated in Cav1-KO and Cav1-RC mice, possibly because *PAI-1* mRNA is mainly expressed in mature adipocytes (data not shown), both lacking caveolin in Cav1-KO and Cav1-RC mice. Altogether, these data demonstrate that endothelium caveolin-1 specifically regulates extravasation of macrophages into adipose tissue.

DISCUSSION

We show here that defective adipose tissue growth and lipodystrophy in mice with global caveolin gene invalidation cannot be rescued by specific re-expression of caveolin in endothelial cells. Among multiple alterations described so far in caveolin-deficient mice, like cardiac and pulmonary defects, lipodystrophy is the first phenotype that cannot be ameliorated by endothelial caveolin rescue. Even a complex phenotype such as progression of atherosclerosis, potentially involving interactions between multiple cell types within the vessel wall, was recently shown to critically depend on endothelial caveolin expression (18). Thus

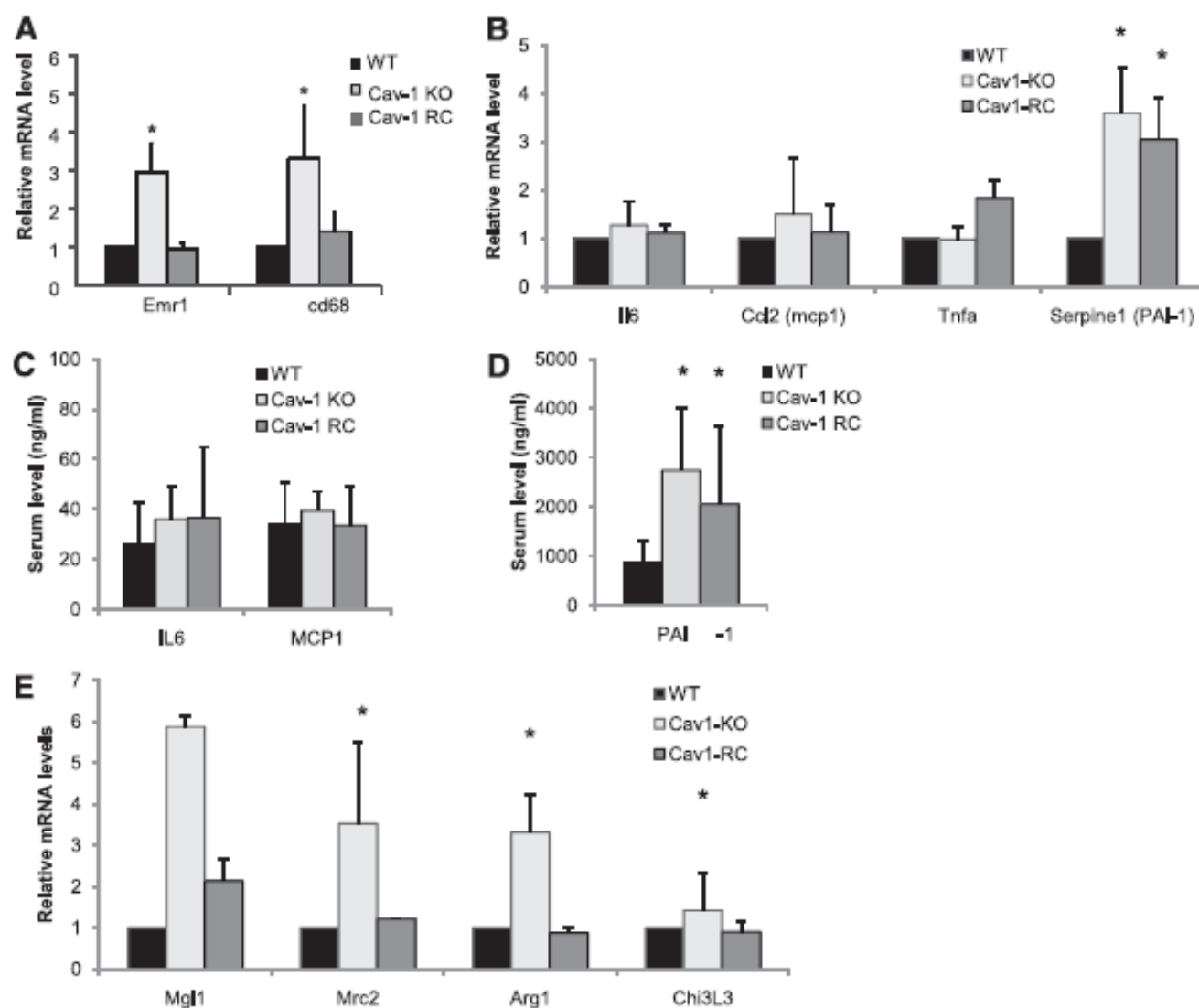


FIG. 4. Macrophage marker analysis in WT mice, Cav1-KO, and Cav1-RC. **A, B,** and **E:** mRNA were extracted from frozen individual perigenital adipose tissues (at least five mice in each group) and used as templates for cDNA synthesis. mRNA were measured by real-time RT-PCR using primers validated for PCR efficiency and single product amplification. For each gene, mRNA levels were normalized to 18S, and values obtained in WT mice were set to 1. **C** and **D:** Circulating IL6, MCP-1, and PAI-1 in 6-month-old mice were measured in serum (5–8 mice/group). Statistically significant differences are indicated (* $P < 0.05$).

our present observation is the first evidence for a functional role of caveolin adipocyte, and not endothelial caveolin in a metabolic phenotype.

The reasons why adipocytes remain atrophic in the total absence of caveolin-1 have not been related to overt alterations in food intake, nutrient absorption, or energy expenditure (8,19). They might be linked to global reduction in adipocyte metabolic activity revealed here by gene expression defects in microarray analysis. Accordingly, autophagic degradation was recently reported in caveolin-deficient adipocytes (20), as well as compromised lipid droplet growth and maturation defects (21).

A second interesting finding is the implication of endothelial caveolin in adipose tissue infiltration by macrophages. Indeed, it has been shown that both transcellular and paracellular pathways, which participate in endothelial barrier function, implicate caveolins (9,22,23).

Macrophage infiltration of adipose tissue is linked to obesity (12,16) and could play a major role in insulin resistance through proinflammatory cytokine production. Previous reports show that macrophage polarity in obesity is mainly M1 proinflammatory, whereas alternatively activated M2 macrophages are usually found in lean (24). In agreement with a previous report on a different lipodystrophic murine model (25), we show an increased number of macrophages in caveolin-1-deficient mice adipose tissue mostly resembling a M2 state. In the complex cascade leading to macrophage recruitment, rescue of adipose tissue macrophage content in Cav1-RC, despite persistent lipodystrophy, suggests a regulatory role for endothelium. In this context, endothelial caveolin-1 thus appears as a new actor for macrophage entry into adipose tissue. This highlights endothelium permeability as a potential target to control obesity-related macrophage infiltration.

In conclusion, our present study identifies distinct roles for caveolin-1, linked to its presence in different cell types within adipose tissue. Adipocyte-derived caveolin is shown here to play a crucial role in lipid storage and global fat cell function, whereas endothelium-derived caveolin can modulate tissue cell composition and macrophage infiltration.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013 under Grant Agreement No. 202272. N.B. is supported by the French Ministry of Research.

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

N.B. researched data, reviewed and edited the article, and contributed to discussion. S.L.L. researched data and wrote the article. W.C.S. and P.F. reviewed and edited the article and contributed to discussion. I.D. researched data and wrote the article.

The authors thank Abdelhamid Benkouhi from the Biochemistry and Metabolism Facility for crucial technical assistance with the Luminex system.

REFERENCES

1. Capesau J, Magré J, Lascos O, et al. Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies. *Biochem Soc Trans* 2005;33:1073–1077
2. Kim CA, Delépine M, Boutet E, et al. Association of a homozygous non-sense caveolin-1 mutation with Bernardini-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1129–1134
3. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, et al. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest* 2009;119:2623–2633
4. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:185–194
5. Hill MM, Bastiani M, Luetterforst R, et al. PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 2008;132:113–124
6. Liu L, Brown D, McKee M, et al. Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab* 2008;8:310–317
7. Briand N, Dugail I, Le Lay S. Cavin proteins: new players in the caveolae field. *Biochimie* 2011;93:71–77
8. Razani B, Combs TP, Wang XB, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002;277:8635–8647
9. Razani B, Engelman JA, Wang XB, et al. Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem* 2001;276:38121–38138
10. Drab M, Verkade P, Elger M, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001;293:2449–2452
11. Murata T, Lin M, Huang Y, et al. Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J Exp Med* 2007;204:2373–2382
12. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003;112:1796–1808
13. Briquet-Laugier V, Dugail I, Ardouin B, Le Léprie X, Lavau M, Quignard-Boulargé A. Evidence for a sustained genetic effect on fat storage capacity in cultured adipose cells from Zucker rats. *Am J Physiol* 1994;267:E439–E446
14. Le Lay S, Lefèvre I, Trautwein C, Dugail I, Krief S. Insulin and sterol-regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) regulation of gene expression in 3T3-L1 adipocytes. Identification of CCAAT/enhancer-binding protein beta as an SREBP-1c target. *J Biol Chem* 2002;277:35625–35634
15. Priiti E, Zucker JD, Clement K, Henegar C. FunNet: an integrative tool for exploring transcriptional interactions. *Bioinformatics* 2008;24:2636–2638
16. Xu H, Barnes GT, Yang Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 2003;112:1821–1830
17. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* 2005;23:344–346
18. Fernández-Hernando C, Yu J, Suárez Y, et al. Genetic evidence supporting a critical role of endothelial caveolin-1 during the progression of atherosclerosis. *Cell Metab* 2009;10:48–54
19. Mattsson CL, Csikasz RI, Shahmoradian IG, Nedergaard J, Cannon B. Caveolin-1-ablated mice survive in cold by nonshivering thermogenesis despite desensitized adrenergic responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E374–E383
20. Le Lay S, Briand N, Blouin CM, et al. The lipostrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes. *Autophagy* 2010;6:754–763
21. Blouin CM, Le Lay S, Eberli A, et al. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res* 2010;51:945–956
22. Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow CW, Lisansky MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 2001;276:48619–48622
23. Millán J, Hewlett L, Glyn M, Toomre D, Clark P, Ridley AJ. Lymphocyte transcellular migration occurs through recruitment of endothelial ICAM-1 to caveolae- and F-actin-rich domains. *Nat Cell Biol* 2005;8:113–123
24. Lumeng CN, Bodzin JL, Sakiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007;117:175–184
25. Herrero L, Shapiro H, Nayer A, Lee J, Shoelson SE. Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:240–245

DISCUSSION

Dans cette étude, nous montrons que la réexpression de cavéoline-1 spécifiquement au niveau de l'endothélium ne permet pas de corriger le phénotype lipoatrophique observé chez les souris *Cav1* (-/-). Parmi les nombreux phénotypes induits par la déficience en cavéoline-1, comme les défauts cardiaques et pulmonaires, le phénotype métabolique de ces animaux est le seul à ne pas être amélioré par la réexpression endothéliale de cavéoline-1. Ces travaux démontrent donc pour la première fois un rôle fonctionnel de la cavéoline-1 adipocytaire, et non endothéliale, dans le phénotype métabolique de ces animaux. Le défaut de stockage lipidique observé chez les souris *Cav1* (-/-) ne résulte pas d'une diminution de la prise alimentaire ou de l'absorption intestinale, ni d'une dépense énergétique accrue. En revanche, ce phénotype pourrait être lié à une réduction globale du métabolisme adipocytaire, révélée ici par des défauts d'expression génique dans les adipocytes des souris *Cav1* RC. En accord, nous avons récemment décrit un processus d'autophagie dans les adipocytes déficients en cavéoline-1 (Le Lay et al., 2010) (**annexe I**) ainsi qu'un défaut de croissance et de maturation des gouttelettes lipidiques en l'absence de cavéoline-1 (Blouin et al., 2010).

Une autre découverte majeure de cette étude concerne l'implication de la cavéoline-1 endothéliale dans la régulation de l'infiltration macrophagique du tissu adipeux (TA). Ce processus d'infiltration a été largement décrit au cours de l'obésité, et pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'insuline *via* la production de cytokines pro-inflammatoires. En effet, les macrophages infiltrés au cours de l'obésité présentent majoritairement un phénotype M1 pro-inflammatoire, tandis que des macrophages de type M2 sont présents dans le TA des individus non-obèses. En accord avec une étude précédente réalisée dans un autre modèle de lipoatrophie murine (Herrero et al., 2010), nous montrons une infiltration accrue de macrophages de type M2 dans le TA des souris *Cav1* (-/-). Le fait que cette infiltration soit corrigée chez les souris *Cav1* RC, malgré une lipoatrophie persistante, souligne l'importance de l'endothélium dans ce processus. La cavéoline-1 apparaît donc comme un nouvel acteur régulant l'entrée des macrophages dans le TA, et pourrait constituer une cible pour le contrôle de l'infiltration macrophagique au cours de l'obésité.

En conclusion, cette étude met en évidence les rôles distincts de la cavéoline-1 en fonction du type cellulaire dans lequel elle est exprimée au sein du tissu adipeux. La cavéoline-1 adipocytaire joue un rôle crucial dans le stockage lipidique adipocytaire, tandis que la cavéoline-1 endothéliale peut moduler la composition cellulaire du tissu adipeux en régulant l'infiltration des macrophages.

RESULTATS EXPERIMENTAUX II

IMPLICATION DE LA CAVEOLINE-1 DANS LE CONTROLE DE LA CAPACITE DE STOCKAGE ADIPOCYTAIRE

BUT DU TRAVAIL

Si les approches de perte de fonction pour le gène de la cavéoline-1 ont clairement démontré l'importance de cette protéine pour le maintien de la capacité de stockage lipidique adipocytaire, aucune étude n'a jusqu'à présent évalué l'effet d'approches de gain de fonction. De telles approches avaient jusqu'ici été freinées par la publication de Bauer et al. montrant que la surexpression endothéliale de cavéoline-1 ne permettait pas d'augmenter le nombre de cavéoles dans un tissu déjà très riche comme l'endothélium (Bauer et al., 2005). Ces travaux suggéraient la présence de facteurs limitant autre que la cavéoline dans la formation des cavéoles, récemment identifiés comme les cavines (pour revue, (Briand et al., 2011a)) (**annexe II**).

L'objectif de cette deuxième partie de mon travail de thèse est de rechercher la fonction biologique que pourraient exercer les cavéolines au niveau du tissu adipeux, plus spécifiquement en testant l'hypothèse selon laquelle la surexpression de cavéoline-1 (combinée aux cavines) permettrait d'augmenter les capacités de stockage adipocytaire et conduire à des adipocytes « *super-sized* ». Au niveau de l'organisme entier, l'expansion du tissu adipeux limiterait la fuite des acides gras libres (retrouvés généralement au niveau du foie, muscle, coeur...) et pourrait ainsi être bénéfique en termes métaboliques en limitant les conséquences pathologiques de cette « lipotoxicité ».

Pour ce faire, nous avons choisi de mettre en place une stratégie originale de surexpression de cavéoline-1 et de ses protéines partenaires cavines dans les adipocytes afin d'étudier le rôle de ces protéines dans les processus fixant la capacité maximale de stockage lipidique adipocytaire.

MATERIELS ET METHODES

Produits chimiques et anticorps - L'ensemble des produits chimiques, l'insuline, la 3-isobutyl-methyl-1-xanthine (IBMX), la dexaméthasone, l'isoprotérénol, la puromycine et l'albumine bovine sont fournis par Sigma-Aldrich. Les inhibiteurs de protéase « Complete » proviennent de Boehringer-Roche Diagnostics et l'hygromycine B de PAA. Les anticorps utilisés dans cette étude proviennent de Cell Signaling (473SerPKB, PKB, β -actin), BD biosciences (Cavéoline-1), BD transduction Lab (Cavine-1), Santa Cruz (Cavine-3), Roche (GFP), Clontech (RFP) et Progen (périlipine-1). Les anticorps secondaires dirigés contre la souris, le lapin, la chèvre ou le cochon d'inde proviennent de Jackson ImmunoResearch Laboratories. Le *sn*-1,2-dioleoylglycerol (DAG), la 1,2- dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (LPC) et le [14C]Oleoyl-CoA sont fournis par Avanti polar lipids.

Culture cellulaire - Les préadipocytes 3T3-L1 et 3T3-F442A (offerts par le Dr J. Pairault, Paris, France) sont cultivés « *Dulbecco's modified Eagle's medium* » (DMEM) à 4,5 g/L de glucose, supplémenté de 10% de Sérum de Veau (SV). La différenciation adipocytaire des 3T3-L1 est induite par l'ajout d'IBMX (100 μ M), de dexaméthasone (0,25 μ M) et d'insuline (1 μ g/ μ L) pendant 2 jours. Les cellules sont ensuite cultivées en DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté de 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les cellules COS 7 sont cultivées en DMEM 4,5 g/L de glucose supplémenté de 10% de SVF.

Génération des lignées stables - Le plasmide contenant la construction Cav1 RFP a été obtenu de L. Pelkmans (Tagawa et al., 2005), celui contenant Cavine-1/PTRF-GFP de R. Luetterforst (Hill et al., 2008) et celui contenant Cavine-3/hSRBC-GFP fourni par R.G Anderson (McMahon et al., 2009). Ces constructions ont été sous-clonées dans des vecteurs rétroviraux pBabe (Addgene) portant un gène de résistance à la puromycine (Cav1 RFP) ou à l'hygromycine B (Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP). La production de virus est obtenue par co-transfection de ces constructions rétrovirales avec un plasmide codant la protéine d'enveloppe du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV) dans des cellules amphotropiques Phoenix gag-pol (obtenues Gary Nolan, Stanford University). Les surnageants sont utilisés pour infecter les préadipocytes 3T3-L1 ou 3T3-F442A en présence de polybrène (4 μ g/ml). Les fibroblastes sont ensuite sélectionnés en présence d'antibiotique (puromycine 4 μ g/ml ou hygromycine B 125 μ g/ml) puis les populations résistantes aux antibiotiques sont différenciées en adipocytes comme décrit précédemment. Pour chaque lignée stable, une lignée contrôle a été générée simultanément.

Infection des 3T3-L1 par adénovirus – La construction adénovirale exprimant cavéoline-1 a été sous-clonée dans le vecteur adénoviral pshuttle-CMV (Agilent technologies) comme décrit

précédemment (He et al., 1998). Les virus sont ensuite produits et amplifiés dans des cellules 293QBI, purifiés sur un gradient de chlorure de césium, puis stockés à -80°C. Les adipocytes 3T3-L1 sont infectés après 4 jours de différenciation dans un milieu DMEM sans sérum pendant 2h, puis complété à 10% SVF pour la nuit. Les milieux sont changés le lendemain (DMEM 10% SVF) et les cellules sont utilisées 72h après l'infection.

Injection des préadipocytes dans les souris Nude – Les études menées sur les souris ont été approuvées par le comité d'éthique « Charles Darwin » pour l'expérimentation animale (N° saisine : Ce5/2011/015). Les souris athymiques Balb/c Nude de 4 à 5 semaines ont été obtenues de chez Charles River Laboratories puis hébergées au CEF (Centre d'exploration fonctionnel du Centre de Recherche des Cordeliers) en respectant un cycle jour/nuit, nourries *ad libitum*. A 6 semaines, les fibroblastes 3T3-F442A sont injectés en sous-cutané au niveau du dos ou du sternum à raison de 3.10^7 cellules par site. Après 4 semaines, 30% de saccharose sont ajoutés à l'eau de boisson. Les souris sont euthanasiées à 14 semaines par dislocation cervicale, et les tissus adipeux endogènes et néoformés sont prélevés.

Mesure des surfaces adipocytaires - Les surfaces adipocytaires sont mesurées sur des coupes histologiques de tissus adipeux, réalisées comme décrit précédemment (Briand et al., 2011b). Sur chaque image, le nombre d'adipocytes est compté et rapporté à la surface totale de l'image. Au moins 5 champs pris au hasard sont quantifiés, correspondant à une moyenne de 200 adipocytes comptabilisés pour chaque tissu adipeux.

Isolation et mesure des gouttelettes lipidiques - Les cellules sont rincées au PBS puis grattées dans un tampon contenant 25mM de Tris pH 7,4, 100mM de KCl, 1mM d'EDTA et 5mM d'EGTA. Les lysats cellulaires sont ensuite placés dans une enceinte hermétique et soumis à une pression de 800 psi d'azote pendant 10 mn. La décompression rapide induit une lyse des cellules permettant de maintenir l'intégrité des organites, et particulièrement des gouttelettes lipidiques adipocytaires (Blouin et al., 2010). Des aliquots des lysats obtenus sont prélevés et étalés sur une lame et au moins 5 images sont prises au microscope optique sur des champs aléatoires. Les gouttelettes lipidiques isolées sont mesurées à l'aide du logiciel Perfect Image (Clara vision). Au moins 200 gouttelettes lipidiques ont été mesurées pour chaque préparation. Les graphiques représentent le pourcentage de gouttelettes lipidiques en fonction de leur diamètre en microns. La distribution est présentée sous la forme d'une moyenne \pm S.E.M pour chaque classe de diamètre.

Microscopie confocale - Les cellules COS7 ou les adipocytes 3T3-L1 sont cultivés sur des lamelles de verre. Après rinçage au PBS 1X, les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde

4% (m/v) pendant 30 mn puis montées dans du milieu de montage contenant du Mowiol (Calbiochem). Les lamelles sont observées au microscope confocal (Zeiss LSM 710).

Microscopie électronique – Les adipocytes 3T3-L1 sont fixés dans du tampon cacodylate 0,1 M (pH 7.4) contenant 2,5% de glutaraldéhyde 0,1M pendant 1h à 4°C puis rincés trois fois à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées dans le tampon cacodylate additionné de 1% d'acide tanique pendant 45 mn à température ambiante. Les échantillons sont post-fixés dans un tampon phosphate 0,1M, OsO₄ 2% pendant une heure à température ambiante. Enfin, les échantillons sont déshydratés dans des concentrations croissantes d'éthanol, infiltrés de résine (Epon Araldite, Polybed 812 embedded kit, Polysciences/Biovalley) et polymérisés à 60°C. Les inclusions sont coupées en sections de 70 nm à l'aide d'un microtome Leica UCT, placées sur des grilles et marquées à l'acétate d'uranyle. Les images sont obtenues à l'aide d'un microscope électronique à transmission Jeol 100CII équipé d'une caméra digitale.

Immunodétection par Western-Blot – Les tissus adipeux ou les adipocytes 3T3-L1 sont lysés dans un volume approprié de tampon de lyse (50 mM Tris pH 7,4, 0,27 M saccharose, 1 mM Na-orthovanadate pH10, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β -glycérophosphate, 50 mM NaF, 5 mM pyrophosphate, 1% (w/v) Triton X-100, 0,1 % (w/v) 2- β mecaptoéthanol, et inhibiteurs de protéases). Les lysats totaux sont centrifugés (15 000g, 4°C pendant 10 mn) puis stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Les concentrations en protéines sont déterminées selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976) avec l'albumine bovine pour standard. Les échantillons sont migrés en SDS/PAGE sur des gels de polyacrylamide, transférés sur des membranes de nitrocellulose (Amersham Biosciences), bloqués 2 h à température ambiante dans du tampon TBS-T (50mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl 0.1% (v/v) Tween-20) additionné de 5% (m/v) de lait écrémé et incubés avec les différents anticorps. Les membranes de nitrocellulose sont rincées 3 fois 5 mn dans le tampon TBS-T avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Les signaux sont révélés en chemiluminescence (Pierce-Perbio Biotechnologies) par exposition sur des films autoradiographiques (Kodak).

PCR quantitative en temps réel – L'analyse des expressions géniques par PCR quantitative en temps réel a été réalisée comme décrit précédemment (Briand et al., 2011b). Le gène de référence 36B4 est utilisé pour normaliser l'expression des gènes d'intérêts.

Coloration à l'huile rouge - La coloration à l'huile rouge est effectuée sur des adipocytes 3T3-L1 après 10 jours de différenciation. Après rinçage au PBS 1X, les cellules sont fixées dans du paraformaldéhyde 4% (m/v) pendant 1h puis incubées dans une solution d'« Oil red O » (Sigma) dilué dans l'isopropanol pendant 2 h.

Dosage des Triglycérides - Les adipocytes 3T3-L1 à 10 jours de différenciation sont lysés dans du NaCl $9/_{00}$ puis les lipides sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (BLIGH and DYER, 1959). Les triglycérides totaux sont dosés à l'aide d'un kit commercial (Triglycérides-TR210, Randox) avec la trioléine pour standard. Les valeurs obtenues sont normalisées aux quantités de protéines.

Evaluation de la sensibilité à l'insuline - Les adipocytes 3T3-L1 sont cultivés dans du milieu DMEM 4,5 g/l de glucose pendant 24h avant l'expérience. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 100 nM d'insuline pendant 10 mn avant d'être lysées.

Mesure de la capacité lipolytique - Les adipocytes 3T3-L1 à 10 jours de différenciation sont cultivés en présence ou en absence d'isoproterenol 10^{-5} M pendant 2 heures. La capacité lipolytique des cellules est évaluée de manière indirecte par le dosage du glycérol dans les milieux de culture à l'aide d'un kit commercial (Glycerol - GY 105, Randox).

Mesure des activités enzymatiques - Les cellules COS 7 transfectées avec les plasmides DGAT2, LPCAT3 et Cav1 RFP sont lysées dans un tampon Tris 100mM NaCl 10 mM (pH 7,4) contenant un cocktail d'anti-protéases (Roche). Les activités enzymatiques sont mesurées en présence de 50 μ M [14 C]Oleoyl-CoA et du substrat approprié c'est-à-dire 200 μ M DAG pour l'activité DGAT2 et 200 μ M LPC pour la LPCAT3 dans un volume final de 200 μ l de tampon Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), BSA délipidée 1mg/ml. La réaction, initiée par l'ajout de de lysat cellulaire (100 μ g de protéines), est réalisée à 37°C pendant 10 mn. La réaction est stoppée par l'ajout de 300 μ l de chloroforme/méthanol 1/2 (v/v) et les lipides sont extraits selon la méthode de Bligh et Dyer (BLIGH and DYER, 1959). Les lipides neutres et les phospholipides sont séparés par chromatographie sur couche mince dans deux mélanges de solvants successifs (CH₂Cl₂/triéthylamine/éthanol/eau (35/35/40/9) puis Isohexane/ethyl acetate (5/1). Les plaques de silice sont ensuite exposées sur un film autoradiographique (Kodak) pendant 48h. Les signaux correspondant aux espèces lipidiques d'intérêt sont grattés sur les plaques de silice. Les échantillons sont mélangés au liquide de scintillation puis comptés à l'aide d'un compteur de radioactivité.

Analyse statistique - Les résultats sont exprimés en moyenne \pm S.E.M. Les valeurs sont examinées par une analyse de variance (ANOVA) ou par un test t de Student. Les valeurs sont considérées comme statistiquement différentes pour * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

RESULTATS

Effets de la surexpression des protéines cavéolaires sur la capacité de stockage lipidique des adipocytes 3T3-L1

A l'aide de vecteurs rétroviraux, nous avons établi 3 lignées adipocytaires 3T3-L1 surexprimant stablement les protéines de fusion Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP. Nous ne sommes pas parvenus à établir de clones surexprimant Cavine-2 après sélection à l'hygromycine. L'ensemble des résultats de validation des lignées stables présentés ci-après ont été obtenus sur au moins trois lignées générées et différenciées indépendamment.

Dans un premier temps, nous avons validé l'expression des transgènes dans les lignées stables. Les protéines de fusion sont détectées à la taille attendue par Western-Blot dans des adipocytes 3T3-L1 différenciés, à l'aide d'anticorps dirigés contre leur marqueur fluorescent (**figure 21A**). Des images de microscopie confocale, réalisées sur des adipocytes 3T3-L1 à 10 jours de différenciation, montrent une localisation majoritairement membranaire des protéines de fusion Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP, en accord avec l'implication de ces protéines dans la formation des cavéoles (**figure 21B**). La protéine Cav1 RFP se localise également à la membrane plasmique mais peut aussi être observée au niveau de pools intracellulaires, notamment à la surface des gouttelettes lipidiques. Cette distribution observée pour les différentes protéines de fusion est conforme à ce qui a été précédemment décrit dans la littérature (Blouin et al., 2010; Hill et al., 2008; McMahon et al., 2009).

Nous avons évalué la capacité de différenciation de ces différentes lignées adipocytaires (**tableau 2**). L'expression des facteurs de transcription impliqués dans le processus de différenciation adipocytaire comme CEBP α (*CCAAT/enhancer-binding protein α*) et PPAR γ (*peroxysome proliferator-activated recepteur γ*) ne varie pas entre les lignées. En accord, les expressions géniques des protéines aP2 et périlipine-1, cibles de PPAR γ , ne sont pas modifiées dans ces lignées. Enfin, nous n'observons pas de variations de l'expression des enzymes de la lipogénèse SCD1 (*stearoyl CoA desaturase 1*) et FAS (*fatty acid synthase*), ni du transporteur d'acides gras CD36. Ces données ont été confirmées au niveau protéique pour FAS et CD36 (résultats non présentés). Le stockage lipidique des adipocytes 3T3-L1 en culture repose sur leur capacité à synthétiser des acides gras à partir de substrats glucidiques. La FAS étant l'enzyme clé régulant ce processus de lipogénèse, nous pouvons

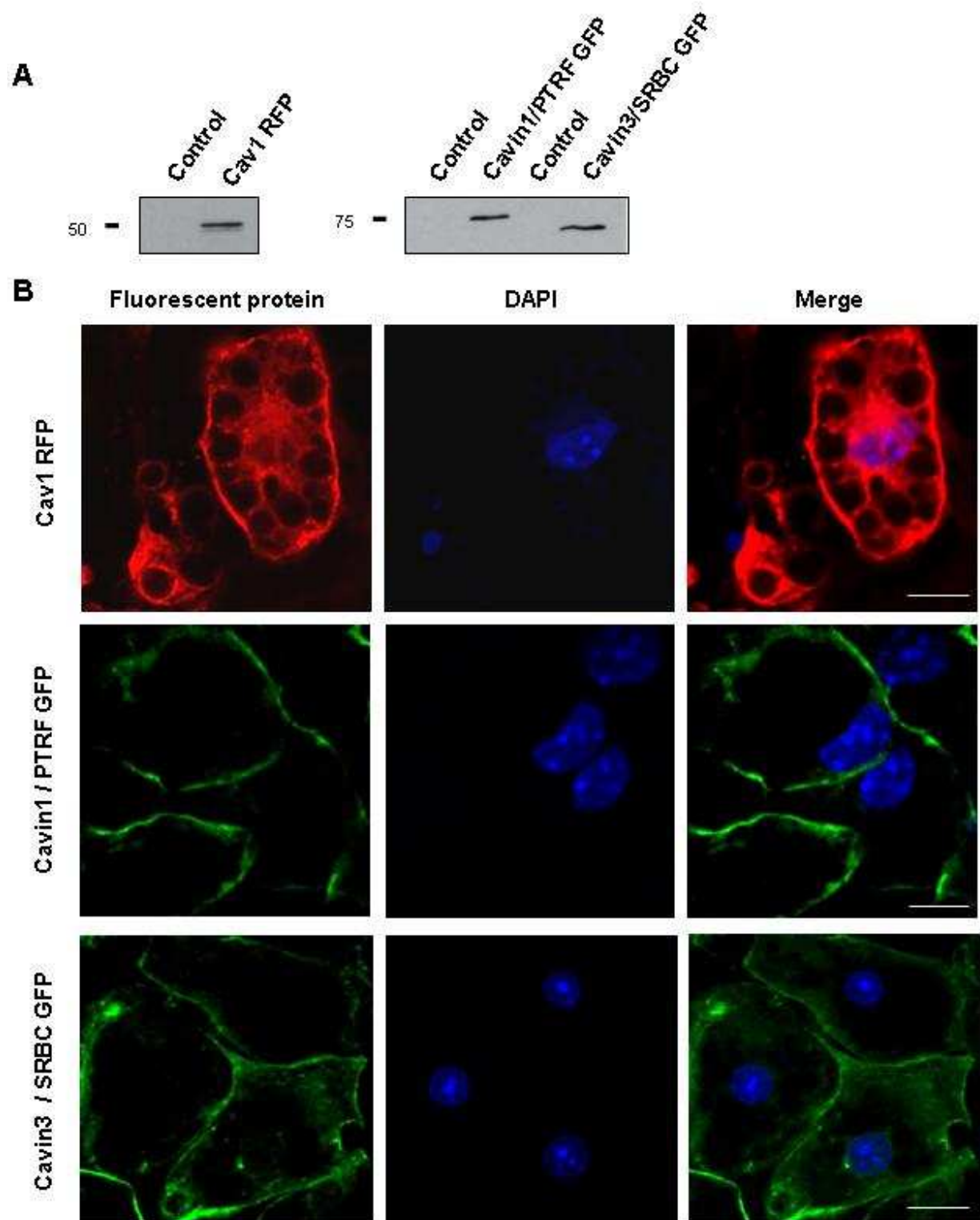


Figure 21 : Validation des lignées stables Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP

A - Immunodétection des protéines de fusion Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP à l'aide d'anticorps dirigés contre la RFP ou la GFP. B - Localisation des protéines de fusion dans les adipocytes 3T3-L1 à 10 jours de différenciation. Echelle : 10 μ m.

conclure que la capacité à synthétiser les acides gras est équivalente dans les lignées Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP.

	Cav1 RFP	Cavin1 GFP	Cavin3 GFP
PPARγ	1,11 \pm 0,07	0,97 \pm 0,49	0,86 \pm 0,09
CEBPβ	1,26 \pm 0,29	1,03 \pm 0,46	0,99 \pm 0,16
aP2	0,69 \pm 0,16	1,00 \pm 0,32	1,09 \pm 0,04
Perilipin 1	1,02 \pm 0,10	1,17 \pm 0,66	1,08 \pm 0,40
FAS	1,13 \pm 0,28	1,15 \pm 0,48	0,64 \pm 0,16
SCD1	1,27 \pm 0,24	1,32 \pm 0,54	0,90 \pm 0,63
CD36	0,65 \pm 0,17	1,48 \pm 0,32	0,83 \pm 0,12

Tableau 2 : Expression de marqueurs de la différenciation adipocytaire dans les 3T3 L1 surexprimant Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP

Après normalisation par rapport au gène de ménage 36B4, les expressions géniques de chaque lignée sont exprimées par rapport à celle de leur contrôle arbitrairement fixé à 1. Les résultats ont été obtenus sur au moins 3 lignées générées et différenciées indépendamment et sont présentés en moyenne \pm S.E.M.

Compte-tenu de l'interdépendance des cavéolines et des cavines pour leurs niveaux d'expression protéique, nous avons évalué l'impact de la surexpression de Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP sur les niveaux d'expression endogène des autres protéines de structure des cavéoles (**figure 22A**). Dans les lignées adipocytaires 3T3-L1 Cav1 RFP et Cavine-3 GFP, les expressions endogènes des cavéolines et des cavines ne sont pas modifiées. En revanche, dans la lignée 3T3-L1 Cavine-1 GFP, l'expression protéique de cavéoline-1 est doublée, tandis que celle de Cavine-3 est réduite de moitié. Afin de déterminer si ces variations dans l'expression protéique sont la conséquence de régulations au niveau transcriptionnel, nous avons mesuré les niveaux d'expression génique des cavéolines et des autres cavines par RT-PCR quantitative dans les adipocytes 3T3-L1 cavine-1 GFP (**figure 22B**). L'expression génique de cavéoline-1 est augmentée de manière significative dans cette lignée, confirmant une régulation de cavéoline-1 par cavine-1. De plus, l'expression de cavine-2 est également augmentée dans les adipocytes Cavine-1 GFP comparé aux adipocytes 3T3-L1 contrôles. En revanche, l'expression génique de cavine-3 ne varie pas, ce qui suggère que la diminution de l'expression protéique de cavine-3 résulte d'un défaut de stabilité de cette protéine dans la lignée surexprimant Cavine-1 GFP. Ces modulations de l'expression des protéines endogènes dans les adipocytes 3T3-L1 Cavine-1 GFP pourraient modifier les niveaux d'expressions relatifs des cavéolines et des cavines. Dans les lignées 3T3-L1 contrôles, cavéoline-1 est la protéine cavéolaire la plus fortement exprimée, cavéoline-2 et les

cavines -1 et -2 présentent des niveaux d'expression comparables, tandis que cavine-3 est la protéine cavéolaire la moins exprimée (**figure 22C**). Les variations dans l'expression des cavéolines et des cavines induites par la surexpression de cavine-1 ne modifient pas les hiérarchies d'expression de ces protéines dans les adipocytes 3T3-L1 Cavine-1 GFP.

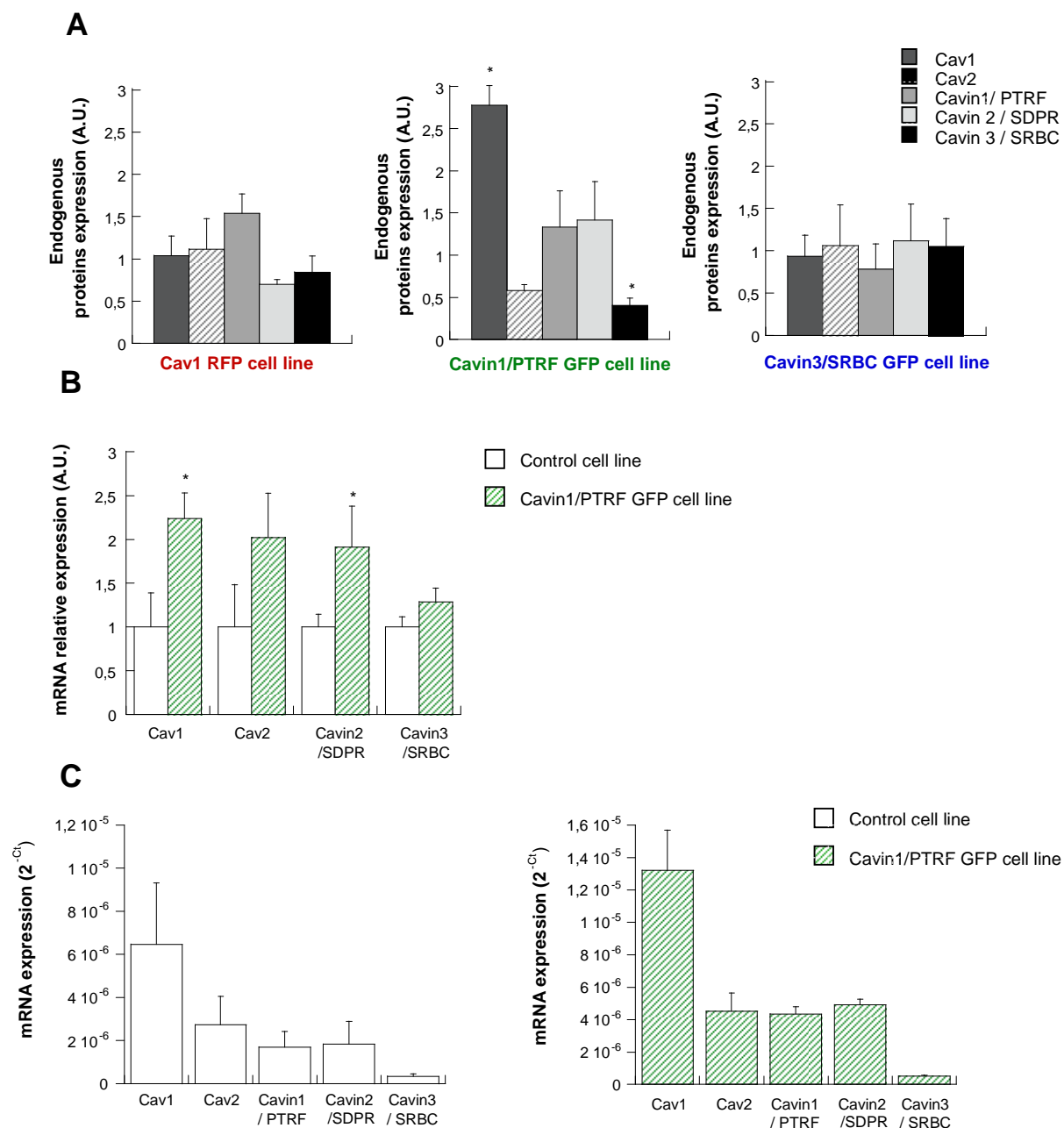


Figure 22 : Expression des protéines cavéolaires dans les lignées stables

A - Expression protéique relative des protéines cavéolaires endogènes dans les lignées Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP comparées à leurs contrôles. B - Expression génique relative des cavéolines et des cavines dans la lignée Cavine-1 GFP. C - Niveaux d'expression des ARNm codant pour les protéines cavéolaire dans les lignées 3T3-L1 contrôles et Cavine-1 GFP. Ces résultats ont été obtenus sur au moins 3 lignées générées et différenciées indépendamment.

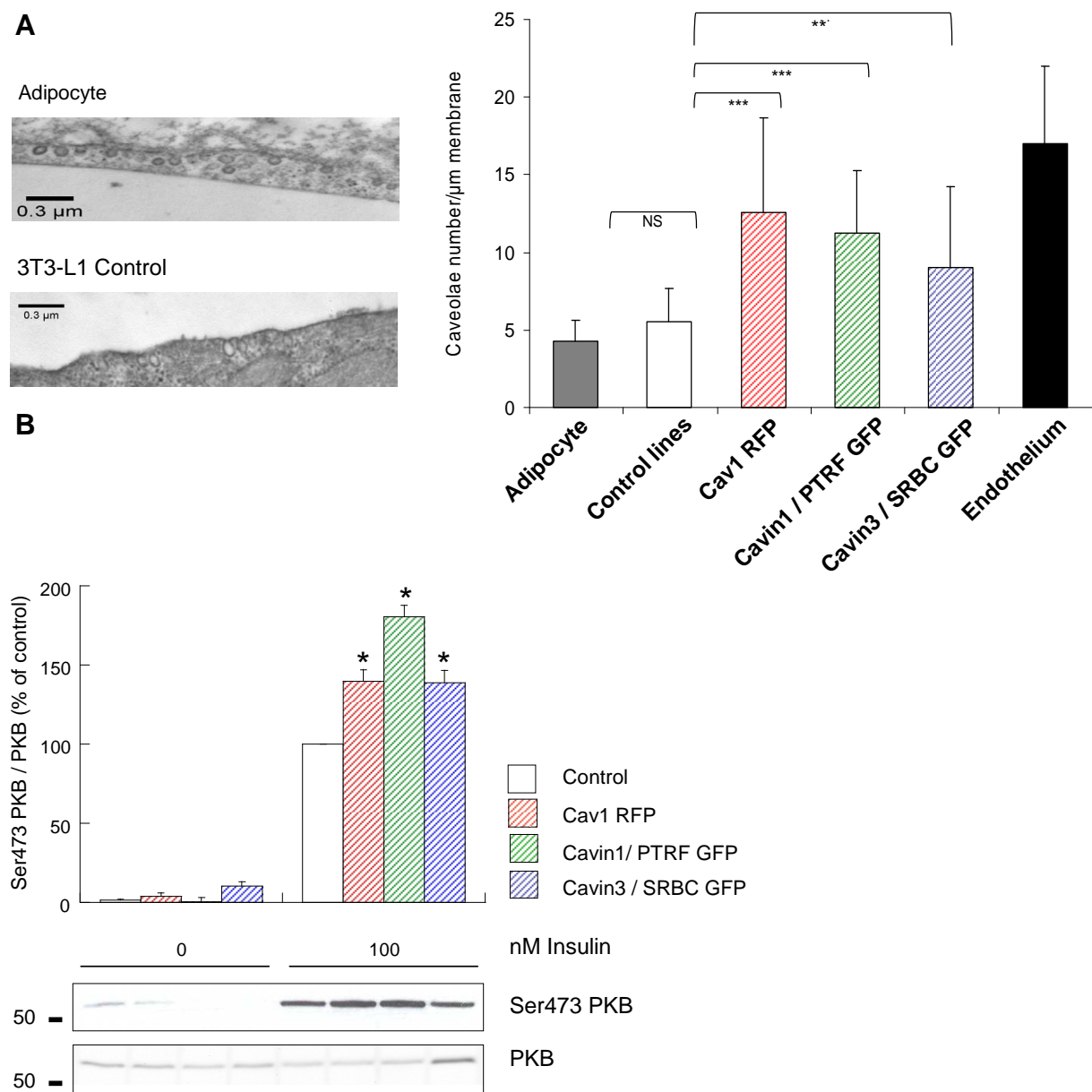


Figure 23 : Augmentation de la densité des cavéoles dans les adipocytes 3T3-L1 surexprimant les protéines cavéolaires

A - Images de microscopie électronique illustrant la forte densité de cavéoles dans un adipocyte murin et un adipocyte 3T3-L1 (panneau gauche). Quantification de la densité cavéolaire, c'est-à-dire du nombre de cavéoles par micromètre de membrane plasmique, effectuée sur des images de microscopie électronique (panneau droit). B - Quantification du niveau de phosphorylation de PKB en réponse à 100nM d'insuline, réalisée à partir de 3 expériences indépendantes.

Afin de déterminer l'impact de la surexpression des protéines cavéolaires sur le nombre de cavéoles dans les adipocytes 3T3-L1, nous avons quantifié le nombre de cavéoles par micromètre de membrane plasmique sur des images de microscopie électronique (**figure 23A**). Dans les lignées 3T3-L1 contrôles, la densité de cavéoles est équivalente à celle d'un adipocyte murin. Dans les lignées 3T3-L1 Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP, le nombre de cavéoles est augmenté de manière significative. En effet, dans ces lignées adipocytaires, la densité de cavéoles à la membrane plasmique est comparable à ce qui peut être observée dans les cellules endothéliales, type cellulaire le plus riche en cavéoles. En accord avec les données de la littérature qui décrivent un rôle positif des cavéoles sur la signalisation insulinique, la phosphorylation de la PKB sur la sérine473 en réponse à une dose maximale d'insuline est augmentée dans les lignées surexprimant les protéines cavéolaires par rapport aux lignées contrôles (**figure 23B**).

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle une surexpression de cavéoline-1 dans les adipocytes 3T3-L1 permettrait d'augmenter la capacité de stockage lipidique de ces cellules. La coloration à l'huile rouge (ORO) des lipides neutres permet d'observer des gouttelettes lipidiques (GLs) de plus grande taille dans les adipocytes surexprimant Cav1 RFP, mais pas dans les lignées Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP (**figure 24A**). Afin de confirmer cette observation réalisée sur des cellules intactes fixées, nous avons mesuré les diamètres de GLs isolées à partir de plusieurs préparations cellulaires. Les résultats, exprimés en proportion de GLs mesurées en fonction de leur diamètre, montrent une distribution gaussienne des tailles de gouttelettes lipidiques (**figure 24B**). Ces distributions se superposent pour les différentes lignées 3T3-L1 contrôles, et les lignées Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP. Dans la lignée surexprimant Cav1 RFP, la courbe de distribution des tailles de GLs est plus large, et décalée vers la droite c'est-à-dire vers les GLs de plus grand diamètre. De ce fait, le diamètre moyen des GLs est significativement augmenté dans la lignée Cav1 RFP (8,87 μm) par rapport à la lignée contrôle (5,03 μm) (**figure 24C**). En terme de capacité stockage lipidique, l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques se traduit par une augmentation sensible, mais non significative, du contenu en triglycérides des adipocytes 3T3-L1 Cav1 RFP par rapport aux adipocytes contrôles (**figure 24D**). Nous observons également un contenu en triglycérides plus important dans la lignée contrôle des 3T3-L1 Cav1 RFP que dans les autres lignées contrôles. Ceci peut s'expliquer par des variations dans la capacité différenciation, probablement liées à la sélection plus rapide des clones résistants à la puromycine par rapport aux clones sélectionnés à l'aide d'hygromycine. Afin de nous affranchir de ces variations dans l'état de différenciation des adipocytes, nous avons surexprimé cavéoline-1 à l'aide d'un vecteur adénoviral dans des adipocytes 3T3-L1 à 7 jours de différenciation. Les adipocytes sont infectés par un adénovirus exprimant cavéoline-1. Les adipocytes contrôles sont infectés par un adénovirus codant la protéine GFP seule, ce qui permet d'évaluer le taux d'infection entre 60% et 80 %. Cette infection permet de doubler le niveau d'expression de cavéoline-1 dans les adipocytes 3T3-L1 différenciés (**figure 24E**). Les gouttelettes lipidiques sont isolées et mesurées 4 jours après l'infection. La surexpression de cavéoline-1 induit bien un déplacement de la courbe de distribution des GLs vers les plus grands diamètres (**figure 24G**), ce qui se traduit par une augmentation significative du diamètre moyen des GLs (**figure 24F**). La surexpression de cavéoline-1 seule (non couplée à RFP), dans des adipocytes 3T3-L1 déjà différenciés, permet bien d'augmenter la taille des gouttelettes lipidiques. L'effet d'une surexpression adénovirale dans des adipocytes déjà différenciés exclut que l'accroissement de la taille des GLs observé résulte d'un effet sur la différenciation adipocytaire.

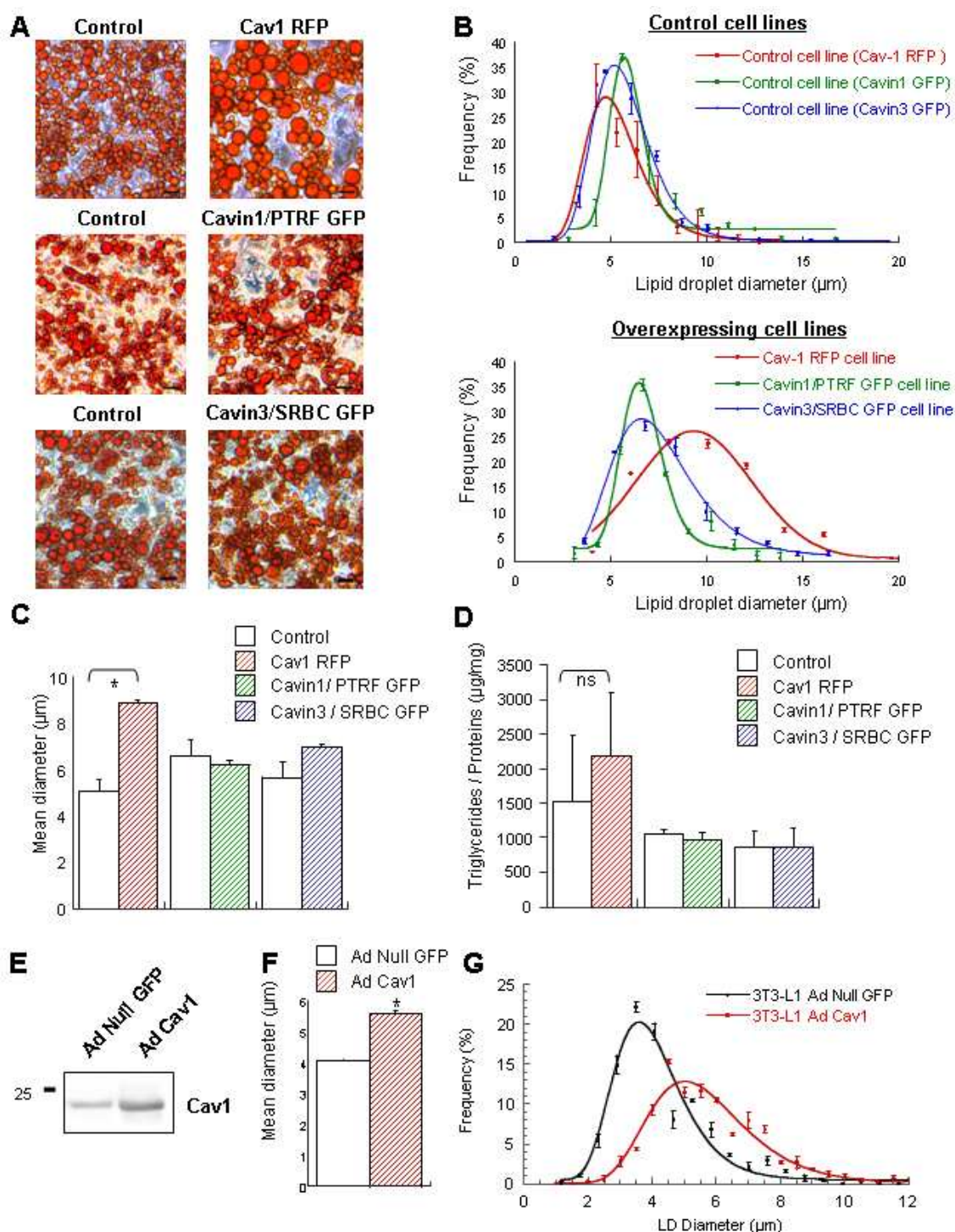


Figure 24 : La surexpression de cavéoline-1 induit la formation de gouttelettes lipidiques de grands diamètres

A - Coloration à l'huile rouge des gouttelettes lipidiques (GL) dans les lignées contrôles et surexprimant Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP. B - Mesures des GLs isolées à partir de ces mêmes lignées. Les résultats sont présentés en pourcentage en fonction du diamètre mesuré. C - Diamètre moyen des GLs isolées à partir de chaque lignée stable. D - Contenu en triglycérides des lignées stables, normalisé aux protéines, à 10 jours de différenciation. E - Immunodétection de cavéoline-1 dans des adipocytes 3T3-L1 infectés par un adénovirus contrôle (Ad Null GFP) ou exprimant cavéoline-1 (Ad Cav1). F - Diamètre adipocytaire moyen des GLs isolées à partir d'adipocytes 3T3-L1 Ad Null GFP et 3T3-L1 Ad Cav1. G - Mesures des GLs isolées à partir de 3T3-L1 Ad Null GFP ou Ad Cav1.

Afin de confirmer ces résultats *in vivo*, nous avons utilisé la propriété des lignées pré-adipocytaires 3T3-F442A de former un tissu adipeux *de novo* lorsqu'elles sont injectées à des souris Nude (Mandrup et al., 1997). Nous avons donc généré des lignées 3T3-F442A surexprimant stablement Cav1 RFP et Cavine-1 GFP. Les fibroblastes 3T3-F442A sont injectés à des souris âgées de 6 semaines (**figure 25A**). Les souris Nude utilisées étant sur un fond génétique balb/c, résistant au régime gras, 30% de saccharose (m/v) sont ajoutés à l'eau de boisson afin de déséquilibrer la balance énergétique et ainsi favoriser le stockage lipidique adipocytaire. L'injection sous-cutanée de 30 millions de fibroblastes au niveau du dos ou du sternum des souris permet d'obtenir un tissu adipeux néoformé bien différencié et parfaitement individualisé des tissus adipeux endogènes (**figure 25B**, panneau de droite). Le poids des tissus adipeux contrôles néoformés varie entre 22,4 et 108 mg et représente donc une proportion significative (entre 12,4 % à 35,73 % respectivement) de la masse adipeuse totale des souris injectées (**Tableau 3**). Par ailleurs, il n'existe pas de corrélation entre le poids des tissus adipeux contrôles néoformés et la surface moyenne des adipocytes mesurée sur des coupes histologiques. Les diamètres moyens des adipocytes néoformés ($4656 \pm 1081 \mu\text{m}^2$) sont du même ordre de grandeur ceux des adipocytes endogènes ($3624 \pm 806 \mu\text{m}^2$). Chez une même souris, des adipocytes contrôles issus de fibroblastes 3T3-F442A injectés dorsalement ou ventralement présentent des surfaces adipocytaires moyennes équivalentes (**figure 25B**). Nous avons donc comparé les tailles des adipocytes contrôles et surexprimant Cav1 RFP ou Cavine-1 GFP injectés chez une même souris. Une analyse par Western-Blot a permis de confirmer l'expression des protéines de fusion dans les tissus adipeux néoformés (**figure 25C**). La surexpression de Cavine-1 n'a pas d'impact sur la surface moyenne des adipocytes mesurée sur des coupes histologiques (**figure 25E**). En revanche, la surexpression de Cav1 RFP permet d'augmenter significativement la taille des adipocytes dans les tissus adipeux néoformés chez 6 souris sur 7 injectées, soit dans plus de 85% des cas. Ces résultats confirment le rôle critique de cavéoline-1 dans le stockage lipidique adipocytaire *in vivo*.

Nude mouse N°		1	2	3	4	5	6
Body weight (g)		25,9	29,8	25,5	28,6	25,8	24,3
Endogenous adipose tissue	Subcutaneous (mg)	207	367	254	345	230	251
	Perigenital (mg)	304	457	219	418	247	242
Neoformed adipose tissue	Dorsal (mg)	50	47	61	22,4	49,1	68
	Sternal (mg)	77	66	108	75,1	41,8	89
Neoformed / Endogenous (%)		24,85	13,71	35,73	12,78	19,06	31,85

Tableau 3 : Poids des tissus adipeux endogènes et néoformés chez les souris Nude

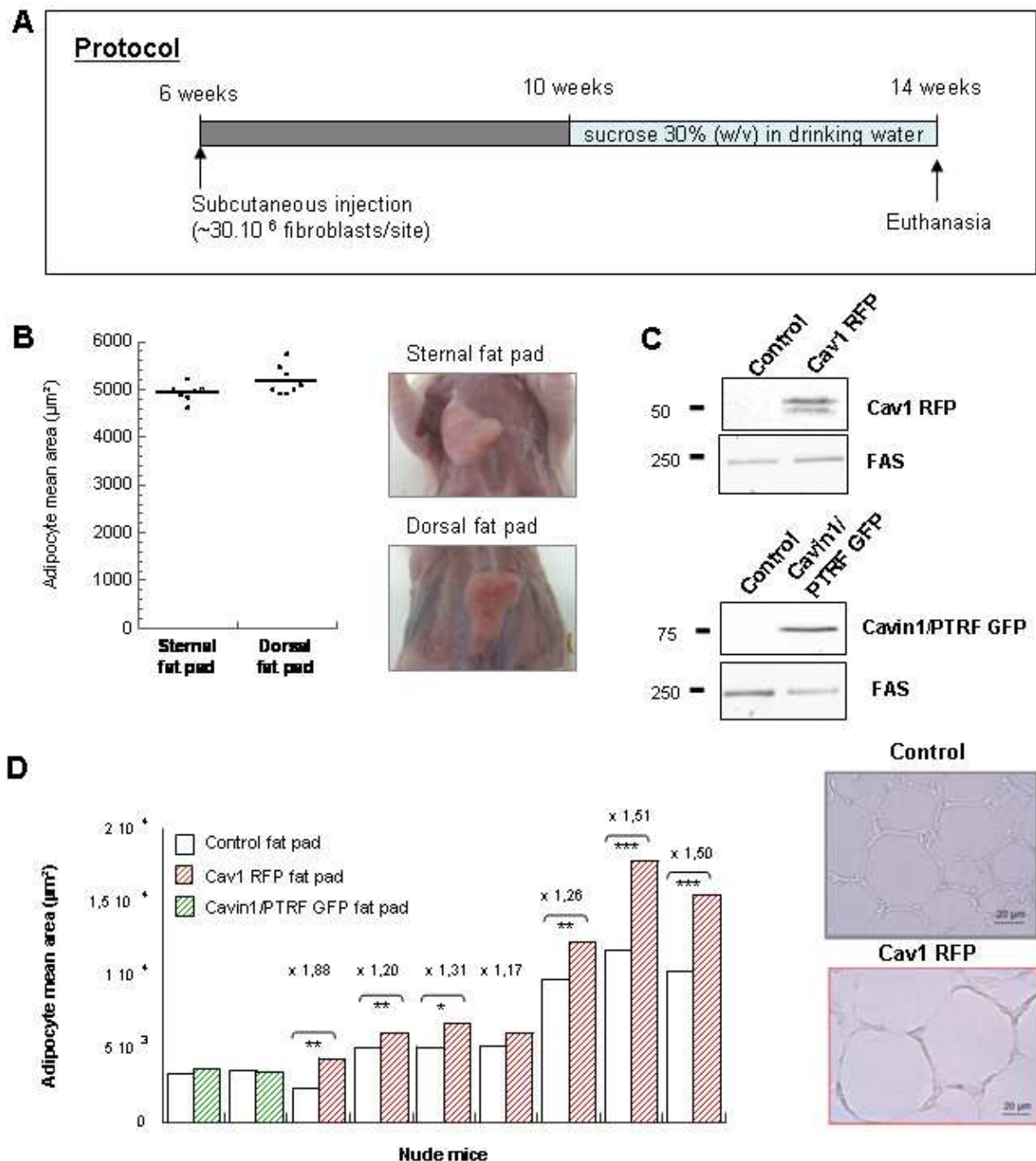


Figure 25 : Surexpression de Cav1 RFP et Cavine-1 GFP chez la souris Nude

A - Schéma décrivant le protocole utilisé pour la génération des tissus adipeux néoformés. B - Mesure des aires adipocytaires moyennes en fonction de la localisation du pannicule adipeux, suite à l'injection de fibroblastes 3T3-F442A contrôles au niveau du sternum et du dos d'un même animal (panneau gauche). Morphologie des pannicules adipeux néoformés suite à l'injection de fibroblastes 3T3-F442A en sous-cutané (panneau droit). C - Immunodétection de protéines de fusion cav1 RFP et Cavine-1 GFP à l'aide d'anticorps dirigés contre le marqueur fluorescent sur des lysats de tissus adipeux néoformés. D - Aires adipocytaires moyennes des tissus adipeux néoformés contrôles et surexprimant Cav1 RFP ou Cavine-1 GFP (panneau gauche). Coupes de tissus adipeux réalisées à partir de tissu adipeux néoformé contrôle ou surexprimant Cav1 RFP (panneau droit).

Dans le but d'évaluer l'impact d'une surexpression de cavéoline-1 sur la capacité de stockage lipidique d'un individu entier, nous avons voulu générer un modèle de souris transgénique surexprimant cavéoline-1 sous contrôle du promoteur aP2 spécifique du tissu adipeux. Nous avons supposé que cette surexpression permettrait une expansion plus importante du tissu adipeux en réponse à un régime gras, avec des effets bénéfiques sur l'ensemble des paramètres métaboliques. Nous avons obtenu 4 animaux fondateurs ayant intégré le transgène aP2-Cav1. Cependant, nous n'avons pas pu mettre en évidence de surexpression suffisante de cavéoline-1 dans le tissu adipeux de ces animaux, probablement en raison de la très forte expression endogène de cavéoline-1 dans ce tissu.

Mécanismes moléculaires impliqués dans les effets de la cavéoline-1 sur l'expansion des gouttelettes lipidiques.

1. L'accroissement des gouttelettes lipidiques ne résulte pas d'une modification de la capacité à mobiliser les lipides dans la lignée 3T3-L1 Cav1 RFP

Une modification dans la capacité lipolytique des adipocytes 3T3-L1 Cav1 RFP pourrait expliquer l'augmentation de la taille des gouttelettes lipidiques. En effet, la cavéoline-1 a la capacité de former un complexe avec la sous-unité catalytique de la PKA et la périlipine-1 (Razani et al., 1999; Razani and Lisanti, 2001). Cette interaction est perdue dans les adipocytes *Cav1* (-/-) ce qui conduit à une altération de la réponse lipolytique (Cohen et al., 2004). Cependant, une publication récente montre au contraire une lipolyse accrue dans les adipocytes déficients en cavéoline-1 (Meshulam et al., 2011). Dans les lignées stables, nous avons mesuré la lipolyse induite par un agoniste des récepteurs β -adrénergiques, l'isoprotérénol. La surexpression des protéines de fusion Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP n'induit pas de modification de la capacité lipolytique des adipocytes 3T3-L1 (**figure 26A**). D'autre part, l'expression de la périlipine-1, qui joue au niveau de la gouttelette lipidique un rôle protecteur vis-à-vis des lipases, n'est pas modifiée dans ces lignées (**figure 26B**). Une diminution de la mobilisation des lipides ne permet donc pas d'expliquer le phénotype des adipocytes 3T3-L1 Cav1 RFP.

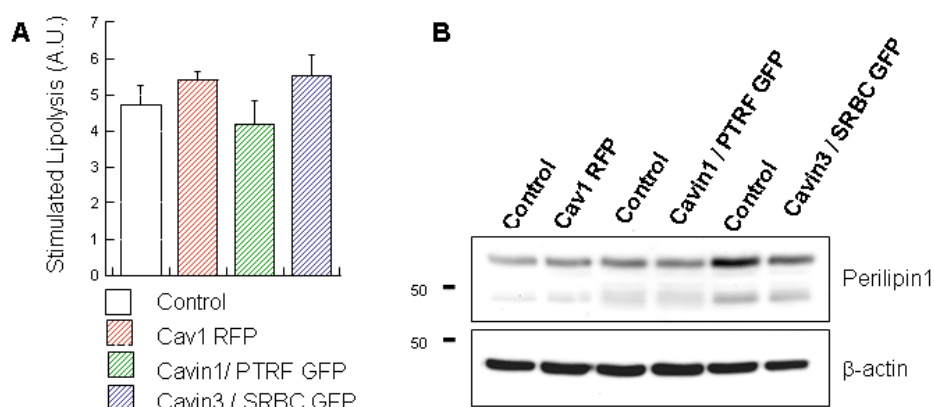


Figure 26 : Mobilisation des lipides dans les lignées stables

A - Réponse lipolytique des adipocytes 3T3-L1 contrôles, Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP évaluée par dosage du glycérol dans les milieux de culture. Les valeurs de 3 expériences indépendantes sont normalisées par rapport au contenu en protéine des cellules et exprimées en unités arbitraires. B - Immunodétection de la périlipine-1 sur des lysats d'adipocytes dans les lignées stables. La β -actin est présentée comme contrôle de dépôt.

2. Détermination du pool cellulaire de cavéoline-1 impliqué dans ses effets sur l'accroissement des gouttelettes lipidiques

Dans la lignée adipocytaire 3T3-L1, la surexpression des protéines de fusion Cav1 RFP, Cavine-1 GFP et Cavine-3 GFP a pour conséquence une augmentation de la densité des cavéoles à la membrane plasmique. En revanche, seule la surexpression de cavéoline-1 permet d'augmenter la capacité de stockage lipidique des adipocytes aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces données suggèrent donc que le rôle de cavéoline-1 dans la croissance des gouttelettes lipidiques serait indépendant des structures cavéolaires. En dehors des cavéoles, la cavéoline-1 peut être localisée dans différents pools intracellulaires. En particulier, la gouttelette lipidique constitue un pool important de cavéolines dans les adipocytes. Nous avons donc voulu tester si une surexpression de cavéoline-1 uniquement au niveau des GLs permettait de reproduire le phénotype des adipocyte 3T3-L1 Cav1 RFP. En l'absence de séquence consensus identifiée permettant d'adresser des protéines à la gouttelette lipidique, nous avons choisi de surexprimer la cavéoline-1 en fusion avec une protéine de la GL, la périlipine-1 (**figure 27A**). Nous avons donc généré à l'aide d'un vecteur rétroviral une nouvelle lignée adipocytaire surexprimant la protéine de fusion Cav1-Péri-GFP, où « Péri » désigne une portion centrale de la périlipine-1 contenant les 3 domaines hydrophobes requis pour sa localisation à la surface des GLs. En parallèle nous avons généré une lignée contrôle surexprimant la protéine de fusion Péri-GFP. L'expression endogène des protéines périlipine-1 et cavéoline-1 reste identique dans ces deux lignées stables (**figure 27B**). Les images de microscopie confocale confirment la localisation spécifique des protéines de fusion Péri-GFP et Cav1-Péri-GFP à la surface des gouttelettes lipidiques (**figure 27C**). Nous avons isolé des gouttelettes lipidiques à partir de ces deux lignées adipocytaires, et plusieurs images de ces préparations ont été prises afin de mesurer les diamètres des GLs. Ces mesures, présentées ici en fréquence en fonction du diamètre, font apparaître un second pic dans la lignée 3T3-L1 Cav1-Péri-GFP, mais pas dans la lignée Péri-GFP, correspondant à une seconde population de gouttelettes lipidiques de grands diamètres (entre 8 et 12 μm) (**figure 27D**). La surexpression de cavéoline-1 spécifiquement à la GL permet donc d'accroître la taille des gouttelettes lipidiques. Ces résultats nous permettent de conclure que l'expansion des gouttelettes lipidique observée en réponse à une surexpression de cavéoline-1 repose une fonction spécifique de cavéoline-1 à la surface de ces organites.

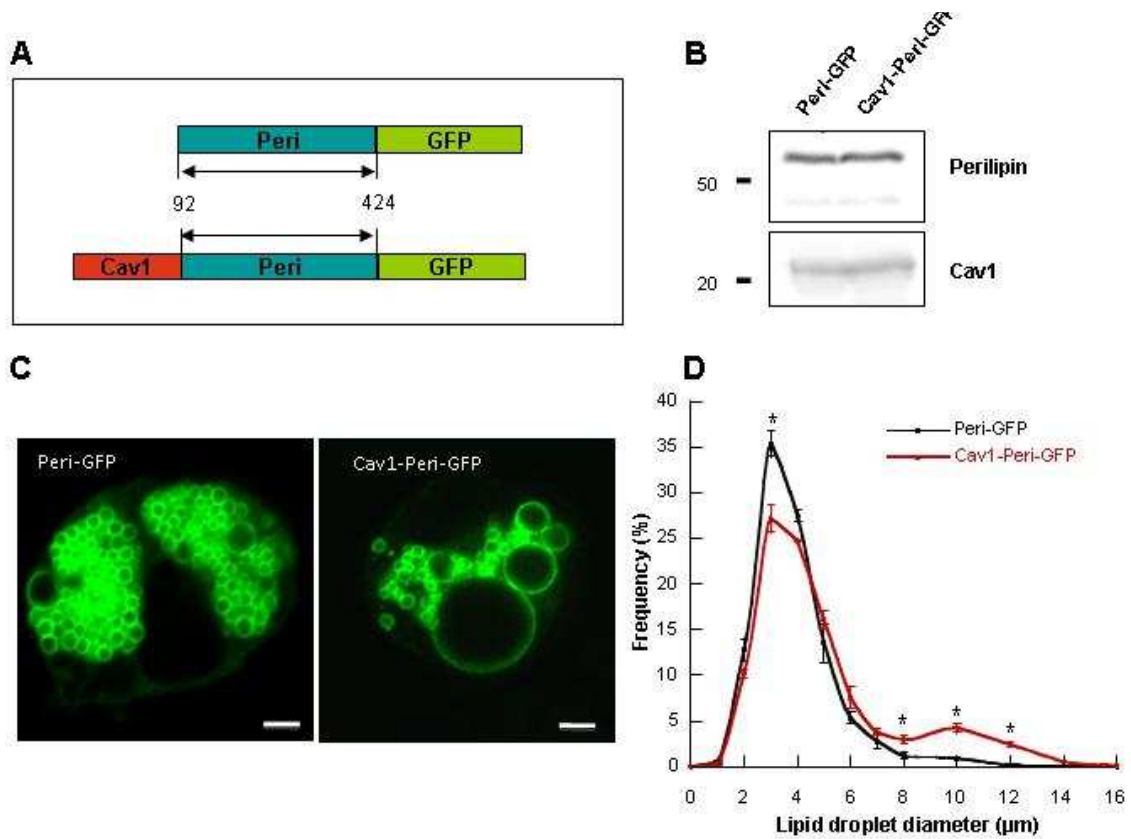


Figure 27 : Surexpression de cavéoline-1 spécifiquement à la gouttelette lipidique

A - Schéma des protéines de fusion Péri-GFP et Cav1-péri-GFP. B - Expression endogène de la périlipine-1 et de la cavéoline-1. C - Images de microscopie confocale montrant la localisation des protéines de fusion Péri-GFP et Cav1-Péri-GFP au niveau des gouttelettes lipidiques dans des adipocytes 3T3-L1. Echelle : 5 μ m. D - Distribution des diamètres des gouttelettes lipidiques isolées à partir des lignées 3T3-L1 Péri-GFP et Cav1-Péri-GFP.

3. Recherche de partenaires potentiels de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique

La cavéoline-1 localisée en dehors des cavéoles conserve sa capacité à interagir avec de nombreuses protéines et à les réguler. Afin de rechercher un partenaire potentiel de cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques, nous avons choisi d'utiliser le modèle cellulaire COS7. En effet, la cavine-1 n'est pas exprimée dans ces cellules (**figure 28A**) excluant la possibilité de ces cellules à former des cavéoles même en présence de cavéoline. De plus, en présence d'acide oléique, la protéine de fusion Cav1 RFP transfectée dans ces cellules se localise exclusivement à la surface des gouttelettes lipidiques. En effet, on observe une colocalisation entre Cav1 RFP et la protéine de fusion ADRP-GFP lorsque ces deux constructions sont co-transfectées dans les cellules COS7 (**figure 28B**). Enfin, nous avons mesuré les diamètres de ces gouttelettes lipidiques après les avoir isolées selon la même méthodologie que pour les adipocytes 3T3-L1. Dans le modèle cellulaire COS7, la surexpression de Cav1 RFP ne modifie pas la distribution des diamètres des GLs isolées (**figure 28C**). Le partenaire potentiel de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique n'est donc pas exprimé dans ces cellules.

A ce jour, quatre mécanismes distincts permettant la croissance des gouttelettes lipidiques ont été décrits (cf. § 1.2.2.3). La fusion des GLs apparaît comme un événement très rarement observé (Murphy et al., 2010). En revanche, plusieurs équipes ont décrit un mécanisme de croissance des GLs *in situ* lié à la présence d'enzymes de synthèse des triglycérides, comme la DGAT2 (Kuerschner et al., 2008), et d'enzymes de synthèse ou de conversion des phospholipides à la surface des GLs (Krahmer et al., 2011; Moessinger et al., 2011). Par ailleurs, des variations dans la composition phospholipidique de la membrane des GLs peuvent altérer ses propriétés surfactantes et ainsi favoriser leur coalescence (Fei et al., 2011). Enfin, un mécanisme de transfert de lipides dépendant de la protéine FSP7 à l'origine de sites de contacts entre des GLs a été récemment décrit (Gong et al., 2011).

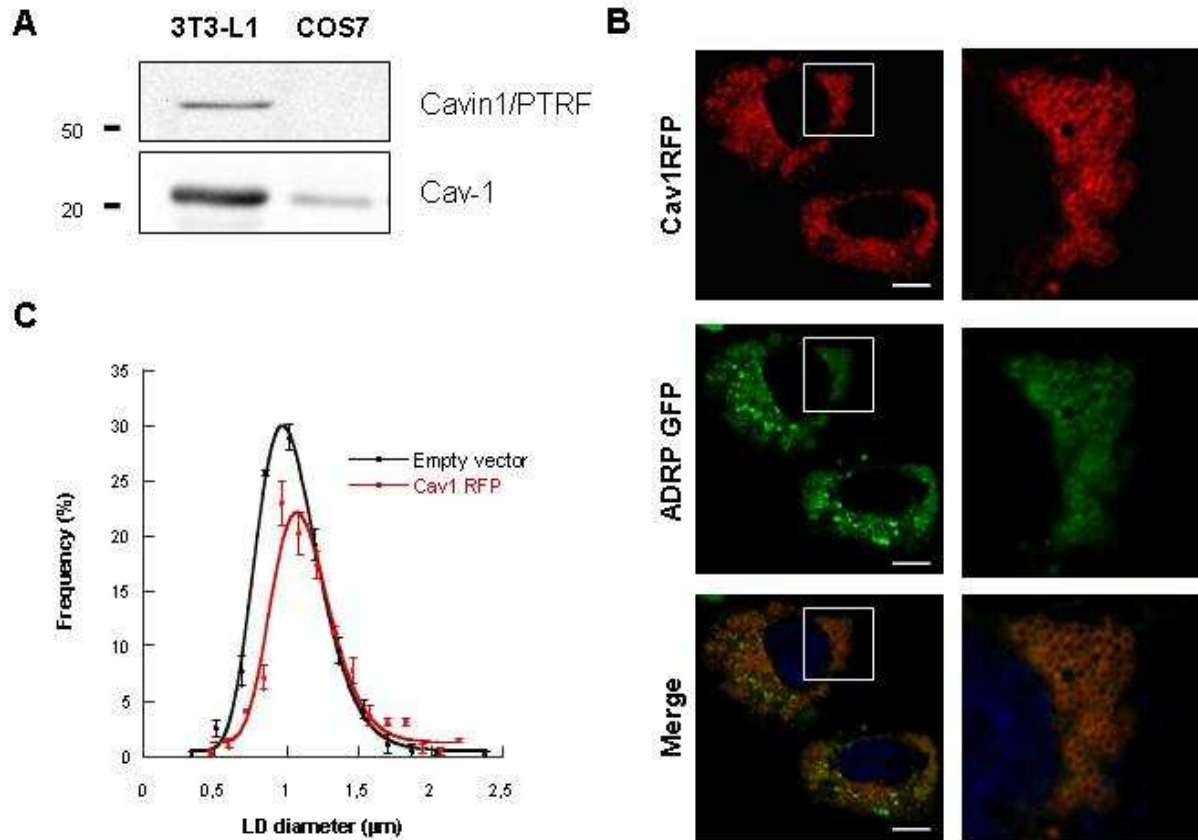


Figure 28 : Validation du modèle cellulaire COS7 pour la recherche de partenaires potentiels de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique

A - Immunodétection de la cavéoline-1 et de la cavine-1 dans des adipocytes 3T3-L1 et des cellules COS7. B - Colocalisation en microscopie confocale des protéines de fusion Cav1 RFP et ADRP-GFP à la surface des gouttelettes dans les cellules COS7 cultivées en présence de 100 μM d'acide oléique couplé à la BSA. Echelle : 5 μm. C - Distribution des diamètres des gouttelettes lipidiques dans des cellules COS7 transfectées par Cav1 RFP ou un vecteur vide.

Afin d'identifier des partenaires potentiels de cavéoline-1 à la surface de la gouttelette lipidique pouvant moduler ces mécanismes d'accroissement des GLs, nous avons recherché *in silico* les protéines présentant une ou plusieurs séquences consensus de liaison à cavéoline-1. Parmi ces protéines, deux sont localisées à la surface de la gouttelette lipidique et pourraient être impliquées dans les effets de cavéoline-1 sur la croissance des gouttelettes lipidiques (**figure 29A**). D'une part, la DGAT2, enzyme de la voie de biosynthèse des triglycérides, a été détectée à la surface des gouttelettes lipidiques (Kuerschner et al., 2008). D'autre part, la LPCAT3, qui catalyse la synthèse de phosphatidylcholine (PC), est potentiellement localisée à la surface des gouttelettes lipidiques par analogie avec les LPCAT1 et LPCAT2 (Moessinger et al., 2011). Les cellules COS7 ont été transfectées avec des plasmides codant pour DGAT2 ou LPCAT3 en absence ou en présence de Cav1 RFP. L'activité des enzymes DGAT2 et LPCAT3 a été mesurée sur des lysats cellulaires en présence de [¹⁴C]-oleoyl-CoA et du substrat approprié. Comme attendu, l'incorporation d'oléate radiomarké dans les triglycérides est augmentée dans les cellules COS7 exprimant la DGAT2 (**figure 29B**). De la même manière, la transfection de la LPCAT3 permet d'augmenter la synthèse de PC dans ces cellules (**figure 29C**). En revanche, la co-transfection de Cav1 RFP ne modifie pas l'activité de ces enzymes dans les cellules COS7. Par conséquent, ces enzymes ne sont probablement pas impliquées dans les effets de cavéoline-1 sur la capacité de stockage lipidique adipocytaire.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence un rôle de cavéoline-1 dans les mécanismes d'accroissement des gouttelettes lipidiques, et ce tant *in vitro* qu'*in vivo*. Nous avons pu établir que ces effets sont indépendants des structures cavéolaires, et reposent sur un rôle spécifique de cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques. En nous basant sur la présence de sites consensus de liaison à cavéoline-1, nous avons sélectionné deux partenaires potentiels de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique, DGAT2 et LPCAT3. L'absence d'effets de cavéoline-1 sur l'activité de ces enzymes dans le modèle COS7 suggère que le mécanisme de croissance *in situ* des gouttelettes lipidiques n'est pas impliqué dans les effets de cavéoline-1.

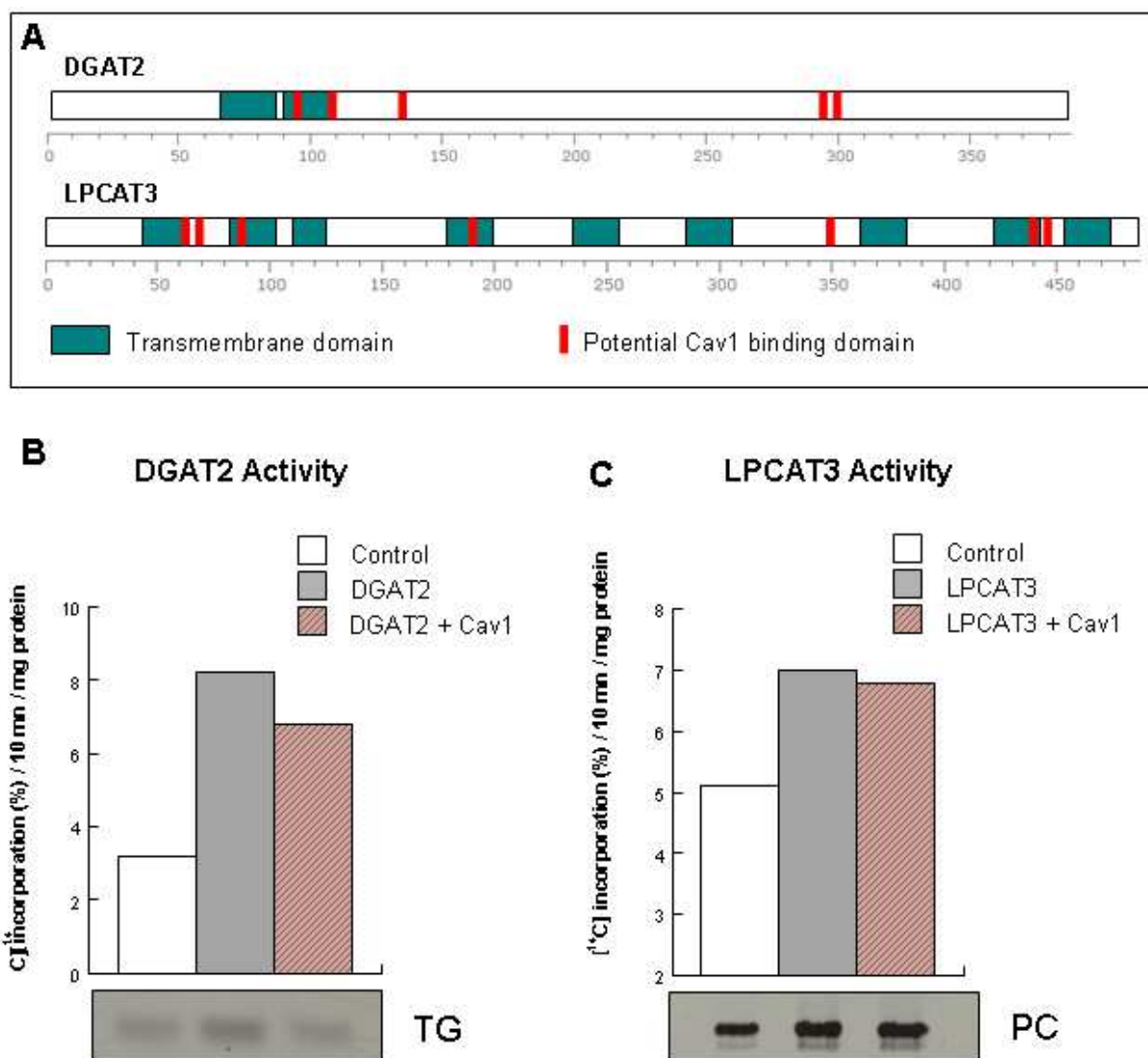


Figure 29 : Co-expression de cavéoline-1 et DGAT2 ou LPCAT3 dans les cellules COS7

A - Schéma représentant les sites de liaison potentiels de cavéoline-1 sur la DGAT2 (*diacylglycérol acyltransferase 2*) et la LPCAT3 (*lysophosphatidic acic acyltransferase 3*). B et C - Mesure des activités enzymatiques de DGAT2 et de la LPCAT3 en présence de cavéoline-1 dans des cellules COS7. L'activité des enzymes est évaluée par l'incorporation d'acide oléique radiomarqué dans des triglycérides (TG) ou les phosphatidylcholines (PC). Les lipides radiomarqués sont visualisés après chromatographie sur couche mince puis comptés

DISCUSSION

L'effet de la surexpression de cavéoline-1 sur la croissance des gouttelettes lipidiques est indépendant des cavéoles

En générant 3 lignées adipocytaires exprimant stablement Cav1 RFP, Cavine-1 GFP ou Cavine-3 GFP, nous avons montré que la surexpression de chacune de ces protéines cavéolaires permet d'augmenter la densité de cavéoles à la membrane plasmique des adipocytes 3T3-L1. Cependant, seule la surexpression de cavéoline-1 permet d'observer un accroissement des gouttelettes lipidiques, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ces résultats montrent que l'effet de cavéoline-1 sur l'expansion des gouttelettes lipidiques est indépendant des structures cavéolaires.

Plusieurs arguments viennent appuyer l'idée selon laquelle cavéoline-1 exerce des fonctions en dehors des cavéoles. Tout d'abord, les cavéolines sont présentes dans différents pools intracellulaires, au niveau de l'appareil de Golgi (Gkantiragas et al., 2001), du réticulum endoplasmique (Smart et al., 1994) ainsi qu'au niveau des gouttelettes lipidiques (Fujimoto et al., 2001; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001). De plus, certaines cellules expriment cavéoline-1 et sont dépourvues de cavéoles. Par exemple, la cavéoline-1 est exprimée dans les lymphocytes et les macrophages bovins où elles se localisent au niveau de l'appareil de Golgi, mais pas à la membrane plasmique, en accord avec l'absence de cavéoles dans ces cellules (Harris et al., 2002). D'autre part, les neurones expriment les 3 isoformes de cavéolines mais sont également dépourvus de cavéoles (pour revue (Masserini et al., 1999)). Enfin, l'animal modèle *Caenorhabditis elegans* exprime un isoforme de cavéoline-1 ne permettant pas la formation de cavéoles (Kirkham et al., 2008).

A l'inverse des cavéoles, dont les nombreuses fonctions sont bien documentées, les rôles fonctionnels de ces pools intracellulaires de cavéolines sont peu connus. Cependant, certaines fonctions cavéolaires de cavéoline-1 sont conservées dans les modèles dépourvus de cavéoles. Notamment, la cavéoline-1 peut interagir avec la phospholipase A2 (PLA2) *via* son domaine «*scaffolding*» (CSD) et ainsi inhiber l'activité de cette enzyme dans les neurones (Gaudreault et al., 2004). Chez *C. elegans*, l'expression d'isoformes dominants négatifs de cavéoline-1, basés sur des mutations impliquées dans les dystrophies musculaires chez l'humain, induit des défauts de neurotransmission et de locomotion (Parker et al., 2007). La cavéoline-1 conserve

donc ses capacités à interagir avec des protéines partenaires et à réguler des voies de signalisation en dehors des cavéoles.

Dans cette étude, nous montrons que la surexpression de cavéoline-1, mais pas des protéines cavines, induit la formation de gouttelettes lipidiques des grands diamètres *in vitro* et *in vivo*. En accord, notre groupe a précédemment démontré que dans une même cellule présentant une distribution hétérogène des tailles de gouttelettes lipidiques, la cavéoline-1 est associée aux GLs de plus grands diamètres (Blouin et al., 2008). De plus, il existe chez les individus obèses une corrélation significative entre l'abondance de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique et le diamètre adipocytaire (Blouin et al., 2010). Dans notre modèle adipocytaire 3T3-L1 Cav1 RFP, la protéine de fusion est présente dans tous les pools intracellulaires. En surexprimant la protéine chimère Cav1-Périlipine1-GFP, adressée spécifiquement à la surface des gouttelettes lipidiques, nous observons l'apparition d'une population distincte de gouttelettes lipidiques de grands diamètres. Ces résultats nous ont permis de mettre en évidence une fonction spécifique de cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques qui contribuerait à favoriser l'expansion de ces organites.

Mécanismes potentiellement mis en jeu par cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques

La croissance des gouttelettes lipidiques (GLs) peut faire appel à quatre mécanismes distincts. Premièrement, il a été démontré que le défaut d'expression de différentes protéines du système de fusion vésiculaire SNARE induit la formation de GLs de taille réduite (Bostrom et al., 2007). Ces données ont conduit à suggérer un rôle important des SNARES dans le mécanisme de fusion des GLs. Cependant, les observations de GLs dans divers types cellulaires par des techniques sophistiquées de microscopie quantitative en temps réel ont montré que ces événements de fusion sont peu fréquents (Murphy et al., 2010). Plus récemment, un autre mécanisme de transfert de lipides dépendant de la protéine FSP27 a été décrit (Gong et al., 2011; Jambunathan et al., 2011). Des expériences de mutagenèse dirigée ont montré que ce processus se décompose en deux étapes séquentielles - le regroupement des GLs puis le transfert des lipides entre GLs - chacune impliquant un domaine distinct de la protéine FSP27 (Jambunathan et al., 2011). Les sites de contact entre GLs sont enrichis en FSP27 qui pourrait *via* la formation d'un pore permettre le transfert des lipides neutres vers la GL de plus grand diamètre (Gong et al., 2011). Par ailleurs, il existe également un mécanisme

de croissance autonome, *in situ*, des gouttelettes lipidiques, ne nécessitant pas d'événements de fusion, et reposant sur la présence d'enzymes de biosynthèse des lipides à la surface des gouttelettes lipidiques (Krahmer et al., 2011; Kuerschner et al., 2008; Moessinger et al., 2011). En accord, une incorporation directe des triglycérides dans les gouttelettes lipidiques a pu être observée (Cheng et al., 2009; Kuerschner et al., 2008). Enfin, plusieurs publications récentes ont mis en évidence le lien entre la composition phospholipidique et la taille des gouttelettes lipidiques (Fei et al., 2011; Horl et al., 2011; Krahmer et al., 2011). En particulier, une analyse génomique à large spectre chez la levure a permis l'identification de mutants présentant des gouttelettes de très grande taille (Fei et al., 2011). Dans la majorité des cas, les gènes mutés sont impliqués dans le métabolisme des phosphatidylcholines (PC). En effet, la diminution de la proportion de PC, phospholipides aux propriétés de surfactants, au profit des phosphatidyléthanolamines (PE) et de l'acide phosphatidique (PA), phospholipides fusogènes, favorise les processus de coalescence et la formation de GLs de grandes tailles (Krahmer et al., 2011). Ces événements de coalescence constituent un mécanisme simple du point de vue physique, reposant sur les propriétés surfactantes de la membrane phospholipidique de la GL.

A la surface des gouttelettes lipidiques, la cavéoline-1 exerce une fonction favorisant la croissance de ces organites. On peut supposer que cette fonction implique la régulation d'un des mécanismes de croissance des GLs précédemment cité. En effet, la cavéoline-1 conserve ses capacités d'interaction et de régulation de protéines cibles dans les pools intracellulaires. En conséquence, les effets de la cavéoline-1 sur la croissance des gouttelettes lipidiques adipocytaires pourraient reposer son interaction avec une protéine partenaire à la surface de ces organites.

La protéine FSP27, spécifique des adipocytes, est localisée à la surface des gouttelettes lipidiques (Brasaemle et al., 2004; Matsusue et al., 2008; Puri et al., 2007) et semble donc constituer un bon candidat. Les souris *Cav1* (-/-) et *Fsp27* (-/-) ont en commun un phénotype lipoatrophique, mais la morphologie des adipocytes diffère entre ces deux modèles murins puisqu'on n'observe pas de gouttelettes lipidiques multiloculaires dans les adipocytes déficients en cavéoline-1 (Nishino et al., 2008; Razani et al., 2002a). Par ailleurs, les images de microscopie confocale montrent une distribution uniforme de cavéoline-1 autour des gouttelettes lipidiques, semblable à celle de la périlipine-1, tandis que FSP27 se trouve enrichi au niveau des points de contact entre les gouttelettes lipidiques (Gong et al., 2011). Toutefois, FSP27 est également visible sous forme de structure en anneaux (Jambunathan et al., 2011;

Nishino et al., 2008). Enfin, la protéine FSP27 ne présente pas de séquence consensus de liaison à cavéoline-1. Il apparaît donc peu probable que cette protéine soit impliquée dans les effets de cavéoline-1 sur l'accroissement des gouttelettes lipidiques.

Alternativement, cavéoline-1 pourrait favoriser la synthèse *in situ* des triglycérides ou des phospholipides qui composent les gouttelettes lipidiques et ainsi favoriser leur croissance. L'enzyme DGAT2, impliquée dans ce processus, peut être localisée à la surface des gouttelettes lipidiques (Kuerschner et al., 2008) et présente plusieurs sites consensus de liaison à cavéoline-1. Cependant, la co-expression de cavéoline-1 avec la DGAT2 dans les cellules COS7 ne modifie pas l'activité de cette enzyme. Dans la même démarche, nous avons choisi d'évaluer l'implication de la LPCAT3 - qui catalyse la synthèse de phosphatidylcholine (PC)- dans les effets de cavéoline-1 sur l'expansion des GLs. En effet, cette enzyme présente de nombreux sites consensus pour cavéoline-1 et les LPCAT-1 et -2 ont récemment été localisées à la surface des GLs (Moessinger et al., 2011). Toutefois, la co-expression de cavéoline-1 n'a pas d'impact sur l'activité de la LPCAT3 dans les cellules COS7. En conséquence, nous ne pouvons pas conclure sur l'implication d'un mécanisme de croissance *in situ* dans les effets de cavéoline-1 sur la croissance des GLs.

Enfin, la surexpression de cavéoline-1 pourrait induire une modification de la composition phospholipidique de la GL et induire leur coalescence. En accord avec cette hypothèse, l'analyse lipidomique des GLs isolées à partir d'adipocytes *Cav1* (-/-) a révélé une diminution de la quantité relative de PS et de lysophospholipides (Blouin et al., 2010). Plusieurs partenaires potentiels pourraient intervenir pour modifier les propriétés de la monocouche phospholipidique. Premièrement, les phospholipides peuvent être remodelés (Moessinger et al., 2011), interconvertis (Horl et al., 2011) ou encore néosynthétisés (Krahmer et al., 2011) à la surface des GLs. Par analogie avec son rôle de stabilisation des protéines dans les cavéoles, la cavéoline-1 pourrait permettre l'ancrage d'enzyme catalysant la synthèse de phospholipides à la surface de la gouttelette lipidique. Une diminution consécutive du ratio PC/PE pourrait alors induire la coalescence des gouttelettes lipidiques (Krahmer et al., 2011). Nous avons par ailleurs classifié l'ensemble des protéines présentant une ou plusieurs séquences consensus de liaison à cavéoline-1 à l'aide des annotations biologiques proposées par «*Gene Ontology*» (GO) (Ashburner et al., 2000) (**figure 30**). De manière intéressante, un grand nombre de ces protéines semblent reliées aux processus de transport des lipides en général, et des phospholipides en particulier. Certaines de ces

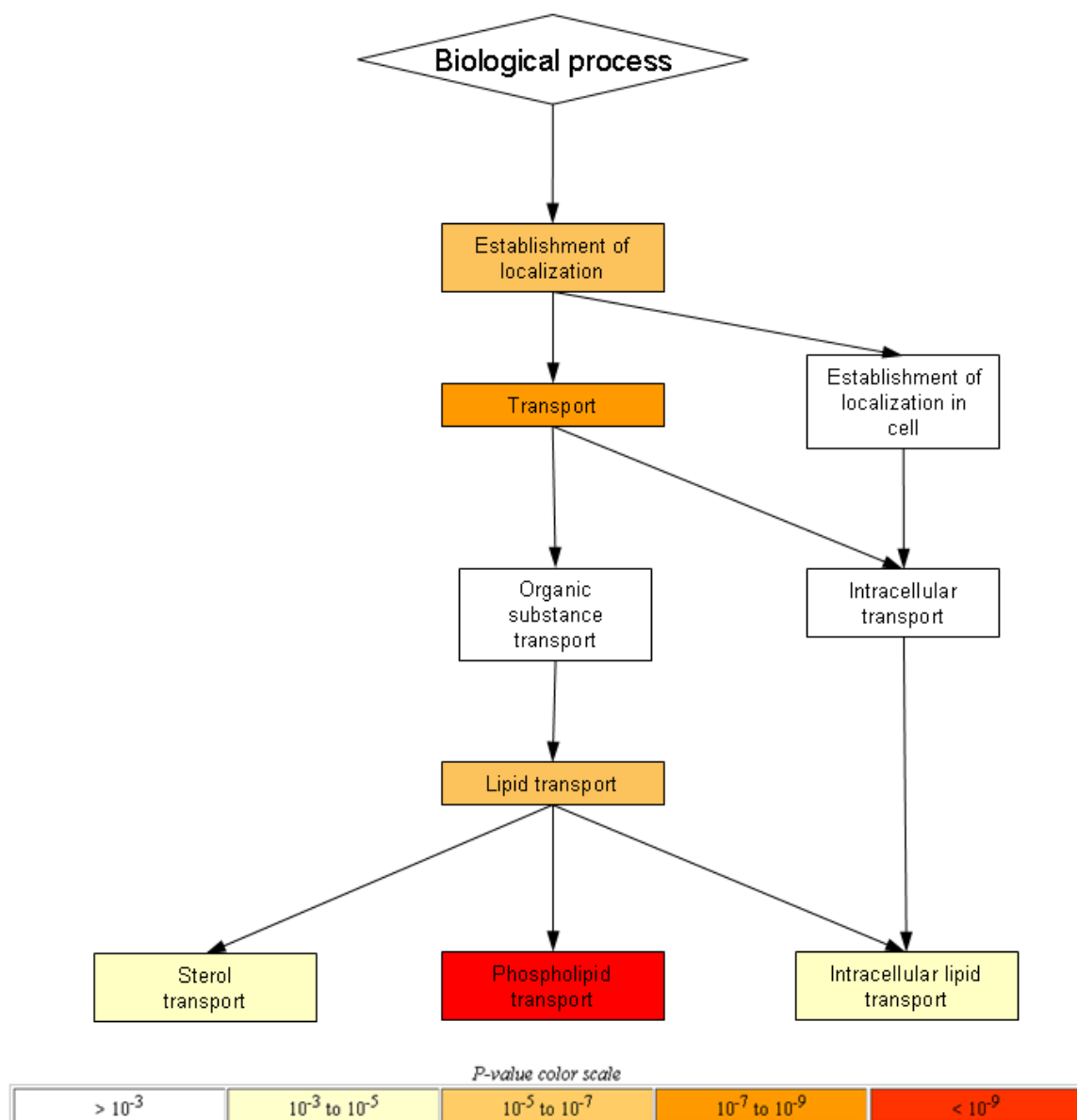


Figure 30 : Processus biologiques associés aux protéines présentant des sites potentiels de liaison à cavéoline-1

L'ensemble des protéines présentant des séquence consensus de liaison à cavéoline-1 ont été classées selon les annotations proposées par « *Gene Ontology* » (Ashburner et al., 2000). Un extrait du diagramme obtenu pour les processus biologiques est présenté.

protéines étant localisées au niveau du réticulum endoplasmique ou de l'appareil de Golgi, la cavéoline-1 pourrait permettre le transfert de phospholipides de ces compartiments cellulaires vers la gouttelette lipidique. Un tel mécanisme est mis en œuvre lors de la biogenèse d'une gouttelette lipidique car la synthèse des PE nécessaire au bourgeonnement d'une gouttelette lipidique nécessite l'action de plusieurs enzymes localisées au niveau du réticulum endoplasmique et des mitochondries (Horl et al., 2011).

De manière plus directe, la présence de cavéoline-1 à la gouttelette lipidique pourrait induire un changement des propriétés physiques de la membrane phospholipidique. En effet, par analogie avec le rôle de réservoir de membrane décrit pour les cavéoles à la membrane plasmique, les cavéolines pourraient moduler les tensions mécaniques de la membrane de la gouttelette lipidique. Il existe en effet des similitudes dans l'organisation des cavéolines à la membrane plasmique et à la gouttelette lipidique. Par des expériences de FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*), notre groupe a précédemment montré que les cavéolines présentent une mobilité membranaire faible au niveau de la GL, comme c'est le cas à la membrane plasmique (Blouin et al., 2010). De plus, les cavéolines forment des oligomères à la surface des GLs, et la cavéoline-1 peut également y être localisée. De par leur capacité à lier le cholestérol, les oligomères de cavéoline pourraient moduler les propriétés dynamiques de la membrane des GLs. En accord, le contenu en cholestérol de la gouttelette lipidique est réduit de manière drastique dans les adipocytes des souris *Cav1* (-/-) (Blouin et al., 2010; Le Lay et al., 2006). La présence de la cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques pourrait ainsi augmenter la capacité de la membrane à s'étirer en réponse à une stimulation du stockage lipidique.

Rôle potentiel de cavéoline-1 dans le métabolisme lipidique de cellules non adipocytaires

Les cavéolines sont des protéines conservées au cours de l'évolution et exprimées de manière quasi ubiquitaire. Notamment, la cavéoline-1 est exprimée dans des cellules impliquées dans la sécrétion de particules riches en triglycérides comme les hépatocytes, les entérocytes ou les cellules épithéliales mammaires. A partir de nos résultats obtenus sur les adipocytes, on peut se demander si cavéoline-1 exerce un contrôle sur le métabolisme lipidique dans d'autres types cellulaires.

Dans des conditions physiologiques (jeûne), les hépatocytes peuvent accumuler une quantité substantielle de triglycérides au sein de gouttelettes lipidiques intracellulaires. Notamment, lors de l'assemblage des VLDLs (*Very Low Density Lipoprotein*), les triglycérides synthétisés par les hépatocytes sont stockés de manière transitoire dans des GLs avant d'être incorporés aux lipoprotéines. La cavéoline-1 pourrait donc moduler la sécrétion des VLDL hépatiques en régulant la capacité de stockage lipidique dans les hépatocytes. En accord, la cavéoline-1 a été impliquée dans les mécanismes de régénération du foie, durant lesquels la formation de GLs constitue un événement déterminant pour la prolifération

cellulaire (Fernandez et al., 2006). En effet, le groupe de R. Parton a montré que les souris *Cav1* (-/-) subissant une hépatectomie partielle présentent un défaut de régénération hépatique en lien avec une accumulation réduite de GLs dans les hépatocytes. Cependant, les mêmes auteurs montrent que ces résultats dépendent du fond génétique des souris *Cav1* (-/-) utilisées (Fernandez-Rojo et al., 2011), expliquant ainsi le fait que d'autres équipes ne soient pas parvenues les reproduire (Mayoral et al., 2007; Mayoral et al., 2010). En ce qui concerne la régulation du contenu hépatique en lipides, bien que les souris *Cav1* (-/-) présentent une hyperlipémie massive en lien avec une lipoatrophie, les analyses histologiques n'ont pas révélé pas de stéatose hépatique chez ces souris (Razani et al., 2002a). Ce phénotype reste en grande partie incompris, même si une étude récente suggère qu'il résulte d'une « inflexibilité métabolique » c'est-à-dire une incapacité à s'adapter à des changements nutritionnels et une dysfonction métabolique généralisée (Wernstedt, I et al., 2012). Il faut ici souligner que l'expression de cavéoline-1 dans le foie provient de divers types cellulaires qui ne sont pas des hépatocytes, comme les cellules endothéliales, les cellules stellaires ou les cellules de Kupffer. En accord, la génération d'un modèle de souris transgénique invalidée pour cavéoline-1 spécifiquement au niveau des hépatocytes n'a pas permis de mettre en évidence un phénotype (Wernstedt, I et al., 2012). De ce fait, il semble peu probable que cavéoline-1 joue un rôle majeur dans le métabolisme lipidique des hépatocytes.

Comme les hépatocytes, les entérocytes peuvent sécréter des lipoprotéines riches en triglycérides, les chylomicrons. Dans le cadre d'un repas hyperlipidique, les TG sont également stockés de manière transitoire au sein de GLs cytoplasmiques (Buschmann and Manke, 1981). Ce pool de TG intracellulaire pourrait constituer un réservoir tampon de TG limitant la concentration plasmatique en chylomicrons après un repas riche en lipides. Les mécanismes cellulaires qui déterminent la formation et la mobilisation de ces GLs restent mal compris et on pourrait imaginer un rôle de cavéoline-1 dans le contrôle de ces mécanismes de stockage. S'il n'existe pas de données concernant un rôle de cavéoline-1 dans le métabolisme des TG dans les entérocytes, on sait en revanche que la cavéoline-1 joue un rôle important pour l'intégrité de la barrière épithéliale intestinale *via* la régulation de la structure des jonctions serrées (Marchiando et al., 2010). Toutefois, les études à large spectre par ARN interférant menées chez *C.elegans* et visant à identifier les gènes impliqués dans le stockage lipidique n'ont pas mis en évidence un rôle majeur des cavéolines dans les cellules intestinales (Ashrafi et al., 2003; Wang et al., 2011b).

En revanche, des données dans la littérature suggèrent un rôle de cavéoline-1 dans la régulation de la sécrétion de particules riches en triglycérides dans les cellules épithéliales mammaires. En effet, l'expression de cavéoline-1 est régulée de manière négative au début de la lactation chez la souris (Park et al., 2001; Renou et al., 2003) et des images de microscopie électronique ont montré l'association de cavéoline-1 avec les gouttelettes lipidiques intracellulaires dans les tissus mammaires de différentes espèces (Hue-Beauvais et al., 2007). De plus, les souris *Cav-1* (-/-) présentent un phénotype mammaire caractérisé par une lactation prématurée (Park et al., 2002), qui s'explique par une sécrétion spontanée de gouttelettes de lait, en l'absence de stimulation (Sotgia et al., 2006). Cependant, il est démontré que cet effet est lié à une activation constitutive de la signalisation STAT5a (*Signal transducer and activator of transcription 5A*) (Sotgia et al., 2006), qui contrôle la progression de la lactogénèse dans la glande mammaire, et non à un effet de cavéoline-1 sur le stockage lipidique dans ces tissus.

L'ensemble de ces données ne permet pas de dégager un modèle général pour la fonction de cavéoline-1 associant les adipocytes et les autres types cellulaires. En effet, il n'y a pas d'arguments solides appuyant l'idée d'un rôle de cavéoline-1 dans le contrôle du métabolisme lipidique dans les cellules non adipocytaires. Toutefois, les stratégies de surexpression de cavéolines dans le foie *in vivo* ont permis de mettre en évidence des effets majeurs sur la sensibilité à l'insuline de ce tissu. Notamment, la surexpression de cavéoline-3 par vecteur adénoviral permet de potentialiser la signalisation insulinique (Otsu et al., 2010). D'autre part, la mise sous silence par un antagomir des micros ARNs 103 et 107 (inhibant l'expression de cavéoline-1 au niveau traductionnel) conduit à une amélioration de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline dans le foie des souris injectées (Trajkovski et al., 2011).

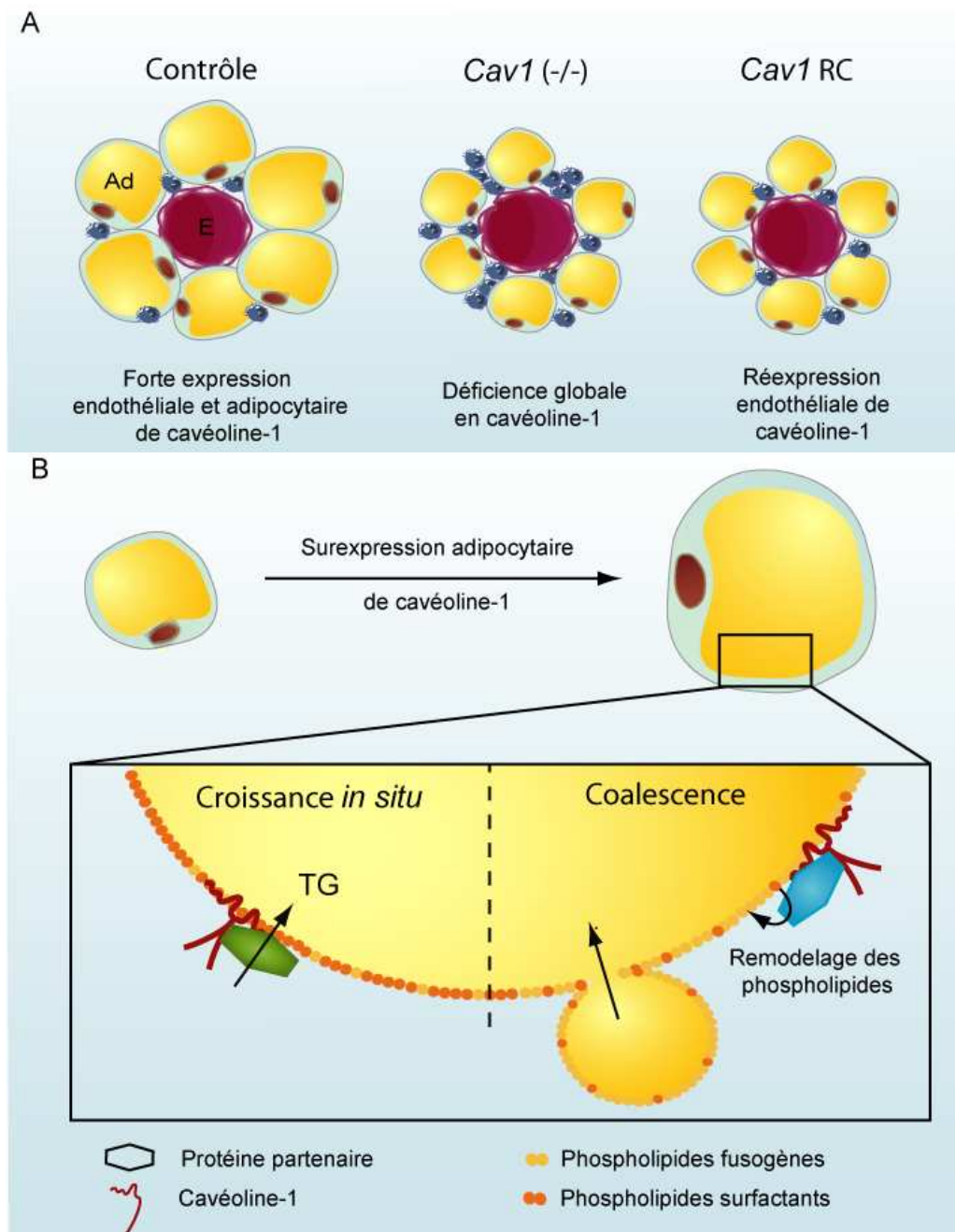


Figure 31 : Effets d'un défaut d'expression et d'une surexpression de cavéoline-1 sur le diamètre adipocytaire et mécanismes potentiellement impliqués

A - Dans le tissu adipeux, une déficiéce en cavéoline-1 (souris *Cav1* (-/-)) a pour conséquence une lipoatrophie qui s'accompagne d'une infiltration de macrophages non inflammatoires. La réexpression endothéliale de cavéoline-1 (souris *Cav1* RC) suffit à corriger cette infiltration macrophagique malgré un phénotype lipoatrophique persistant. La réduction du diamètre adipocytaire est donc la conséquence de la perte de fonction de cavéoline-1 dans l'adipocyte. B - A l'inverse, la surexpression adipocytaire de cavéoline-1 permet d'augmenter la taille des gouttelettes lipidiques et donc d'accroître le diamètre adipocytaire *in vivo*. Ce phénotype repose sur un rôle spécifique de cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques. Cette expansion des gouttelettes lipidiques pourrait résulter de mécanismes de croissance *in situ* ou de phénomènes de coalescence. Ad, adipocyte ; E, endothélium

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

En comparant les phénotypes adipeux des souris *Cav1* (-/-) et *Cav1* RC, nous avons établi l'existence de rôles distincts de la cavéoline-1 en fonction du type cellulaire dans lequel elle est exprimée au sein du tissu adipeux (**figure 31A**). En effet, le phénotype lipoatrophique persistant malgré la réexpression endothéliale de cavéoline-1 met en exergue le rôle majeur de la cavéoline-1 adipocytaire dans le stockage lipidique. D'autre part, cette étude a révélé l'implication de la cavéoline-1 endothéliale dans les mécanismes conduisant à l'infiltration macrophagique du tissu adipeux. De plus, en adoptant une stratégie de surexpression de cavéoline-1 et de ses partenaires les protéines cavines, nous montrons que seule la surexpression de cavéoline-1 favorise la croissance des gouttelettes lipidiques *in vitro* dans la modèle adipocytaire 3T3-L1, et donc la formation d'adipocytes de grands diamètres *in vivo* chez la souris Nude (**figure 31B**). Enfin, nous avons démontré que cet effet est indépendant des structures cavéolaires et repose sur une fonction de cavéoline-1 à la surface des gouttelettes lipidiques. A la surface de cet organite, cavéoline-1 pourrait interagir avec une protéine partenaire impliquée dans le transport, la synthèse ou encore dans le remodelage des phospholipides de surface des gouttelettes lipidiques. En fonction du partenaire impliqué, l'expansion des gouttelettes lipidiques pourrait donc résulter d'un mécanisme de croissance autonome, *via* la synthèse *in situ* des composants lipidiques, ou de phénomènes de coalescence.

En perspective de ce travail, nous nous concentrerons sur la recherche et l'identification d'un ou de plusieurs partenaires de cavéoline-1, impliqués dans sa fonction à la surface des gouttelettes lipidiques adipocytaires. Le phénotype endothélial observé chez les souris *Cav1* (-/-) a été relié une suractivation de la protéine eNOS, tandis que le phénotype musculaire des souris *Cav3* (-/-) est consécutif à un défaut d'interaction avec le complexe dystroglycane. Quelles ont été les démarches expérimentales ayant conduit à l'identification de ces partenaires des cavéolines dans l'endothélium et le muscle squelettique ? L'interaction entre eNOS et cavéoline-1 a été découverte lors d'études visant à déterminer les voies de régulation d'eNOS, connue pour être un important régulateur des fonctions cardiaques et endothéliales via la production de NO. Dans un premier temps, des expériences de fractionnement subcellulaire ont démontré la localisation d'eNOS au niveau des cavéoles (Garcia-Cardena et al., 1996b; Shaul et al., 1996). Des expériences de co-

immunoprécipitation ont par la suite permis de mettre en évidence son interaction avec la cavéoline-1 dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales (Feron et al., 1996; Garcia-Cardena et al., 1996a). Le rôle majeur de cavéoline-1 dans la régulation d'eNOS a ensuite été confirmé par le phénotype cardiovasculaire observé chez les souris *Cav1* (-/-). Concernant cavéoline-3, son interaction avec le complexe multi-protéique dystrophine-dystroglycane a été suggérée par des expériences d'immuno-localisation montrant sa présence au niveau du sarcolemme, et par un co-fractionnement subcellulaire de cavéoline-3 avec le complexe dystroglycane (Song et al., 1996). Par la suite, une approche ciblée a permis de révéler une interaction entre cavéoline-3 et le β -dystroglycane par co-immunoprécipitation (Sotgia et al., 2000). Par la suite, des mutations sur le gène de la cavéoline-3 ont été identifiées dans plusieurs pathologies musculaires, rassemblées sous le terme de cavéolinopathies.

Par analogie, nous avons envisagé une approche ciblée sur des partenaires potentiels. Afin de sélectionner et de limiter les protéines candidates, nous avons pris comme critères leur localisation à la GL et la présence d'un domaine de liaison au domaine « *scaffolding* » de cavéoline-1, connu pour être impliqué dans un certain nombre d'interactions protéiques. Cette approche « candidat » nous a conduits à tester l'activité enzymatique de plusieurs enzymes du métabolisme lipidique dans les cellules COS7, en présence ou en absence de cavéoline-1. Elle s'est avérée jusqu'à maintenant infructueuse et difficile car nécessitant l'adaptation de la démarche expérimentale à chaque enzyme testée.

Par conséquent, nous envisageons maintenant des stratégies plus globales. La stratégie la plus naturelle consisterait à identifier par analyse protéomique les protéines immunoprécipitant avec cavéoline-1. Cependant, la cavéoline-1 est présente dans de nombreux pools intracellulaires dans l'adipocyte et une telle approche n'exclurait pas les nombreuses protéines des cavéoles. Ainsi, le ciblage de la cavéoline-1 spécifiquement à la gouttelette lipidique (protéine de fusion cav1-Péri-GFP) offre une stratégie alternative permettant l'immunoprécipitation de partenaires spécifiques de cavéoline-1 à la GL.

Une autre approche reposerait sur un criblage fonctionnel haut débit pour lequel nous testerions les effets de la mise sous silence de l'expression de protéines sur le stockage lipidique dépendant de cavéoline-1. Pour ce faire, nous réutiliserons un modèle cellulaire précédemment développé au laboratoire (Blouin et al., 2010) dans lequel la réexpression de cavéoline dans des fibroblastes *Cav1* (-/-) permet d'augmenter les capacités de stockage

lipidique. Le criblage par une banque d'ARN interférents sur des cellules exprimant ou non cavéoline-1 permettra l'identification de partenaires spécifiques de cavéoline-1 influençant le contenu lipidique des cellules.

BIBLIOGRAPHIE

- Aboulaich, N., Chui, P. C., Asara, J. M., Flier, J. S. and Maratos-Flier, E.** (2011). Polymerase I and transcript release factor regulates lipolysis via a phosphorylation-dependent mechanism. *Diabetes* 60, 757-765.
- Aboulaich, N., Vainonen, J. P., Stralfors, P. and Vener, A. V.** (2004). Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem. J.* 383, 237-248.
- Agarwal, A. K., Arioglu, E., De, A. S., Akkoc, N., Taylor, S. I., Bowcock, A. M., Barnes, R. I. and Garg, A.** (2002). AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. *Nat. Genet.* 31, 21-23.
- Anderson, R. G., Brown, M. S. and Goldstein, J. L.** (1977). Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell* 10, 351-364.
- Ando, T., Ishiguro, H., Kimura, M., Mitsui, A., Mori, Y., Sugito, N., Tomoda, K., Mori, R., Harada, K., Katada, T. et al.** (2007). The overexpression of caveolin-1 and caveolin-2 correlates with a poor prognosis and tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 18, 601-609.
- Arbuzova, A., Wang, L., Wang, J., Hangyas-Mihalyne, G., Murray, D., Honig, B. and McLaughlin, S.** (2000). Membrane binding of peptides containing both basic and aromatic residues. Experimental studies with peptides corresponding to the scaffolding region of caveolin and the effector region of MARCKS. *Biochemistry* 39, 10330-10339.
- Arkan, M. C., Hevener, A. L., Greten, F. R., Maeda, S., Li, Z. W., Long, J. M., Wynshaw-Boris, A., Poli, G., Olefsky, J. and Karin, M.** (2005). IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 11, 191-198.
- Arner, P., Bernard, S., Salehpour, M., Possnert, G., Liebl, J., Steier, P., Buchholz, B. A., Eriksson, M., Arner, E., Hauner, H. et al.** (2011). Dynamics of human adipose lipid turnover in health and metabolic disease. *Nature* 478, 110-113.
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T. et al.** (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat. Genet.* 25, 25-29.
- Ashrafi, K., Chang, F. Y., Watts, J. L., Fraser, A. G., Kamath, R. S., Ahringer, J. and Ruvkun, G.** (2003). Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature* 421, 268-272.

- Aung, C. S., Hill, M. M., Bastiani, M., Parton, R. G. and Parat, M. O.** (2011). PTRF-cavin-1 expression decreases the migration of PC3 prostate cancer cells: role of matrix metalloprotease 9. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 136-142.
- Baerga, R., Zhang, Y., Chen, P. H., Goldman, S. and Jin, S.** (2009). Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy.* 5, 1118-1130.
- Bai, L., Deng, X., Li, J., Wang, M., Li, Q., An, W., A D and Cong, Y. S.** (2011a). Regulation of cellular senescence by the essential caveolar component PTRF/Cavin-1. *Cell Res.* 21, 1088-1101.
- Bai, L., Deng, X., Li, Q., An, W., A D, Gao, Z., Xie, Y., Dai, Y. and Cong, Y. S.** (2011b). Down-regulation of the cavin family proteins in breast cancer. *J. Cell Biochem.*
- Bartholomew, J. N., Volonte, D. and Galbiati, F.** (2009). Caveolin-1 regulates the antagonistic pleiotropic properties of cellular senescence through a novel Mdm2/p53-mediated pathway. *Cancer Res.* 69, 2878-2886.
- Bartz, R., Li, W. H., Venables, B., Zehmer, J. K., Roth, M. R., Welti, R., Anderson, R. G., Liu, P. and Chapman, K. D.** (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48, 837-847.
- Bastiani, M., Liu, L., Hill, M. M., Jedrychowski, M. P., Nixon, S. J., Lo, H. P., Abankwa, D., Luetterforst, R., Fernandez-Rojo, M., Breen, M. R. et al.** (2009). MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J. Cell Biol.* 185, 1259-1273.
- Bauer, P. M., Yu, J., Chen, Y., Hickey, R., Bernatchez, P. N., Looft-Wilson, R., Huang, Y., Giordano, F., Stan, R. V. and Sessa, W. C.** (2005). Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 204-209.
- Bernatchez, P., Sharma, A., Bauer, P. M., Marin, E. and Sessa, W. C.** (2011). A noninhibitory mutant of the caveolin-1 scaffolding domain enhances eNOS-derived NO synthesis and vasodilation in mice. *J. Clin. Invest* 121, 3747-3755.
- Betz, R. C., Schoser, B. G., Kasper, D., Ricker, K., Ramirez, A., Stein, V., Torbergson, T., Lee, Y. A., Nothen, M. M., Wienker, T. F. et al.** (2001). Mutations in CAV3 cause mechanical hyperirritability of skeletal muscle in rippling muscle disease. *Nat. Genet.* 28, 218-219.
- Biddinger, S. B. and Kahn, C. R.** (2006). From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu. Rev. Physiol* 68, 123-158.
- BLIGH, E. G. and DYER, W. J.** (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol* 37, 911-917.
- Blouin, C. M., Le, L. S., Eberl, A., Kofeler, H. C., Guerrera, I. C., Klein, C., Le, L., X, Lasnier, F., Bourron, O., Gautier, J. F. et al.** (2010). Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J. Lipid Res.* 51, 945-956.

- Blouin, C. M., Le, L. S., Lasnier, F., Dugail, I. and Hajduch, E.** (2008). Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376, 331-335.
- Bluher, M., Michael, M. D., Peroni, O. D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B. B. and Kahn, C. R.** (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 3, 25-38.
- Bonilla, E., Fischbeck, K. and Schotland, D. L.** (1981). Freeze-fracture studies of muscle caveolae in human muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 104, 167-173.
- Borg, J., Klint, C., Wierup, N., Strom, K., Larsson, S., Sundler, F., Lupi, R., Marchetti, P., Xu, G., Kimmel, A. et al.** (2009). Perilipin is present in islets of Langerhans and protects against lipotoxicity when overexpressed in the beta-cell line INS-1 1. *Endocrinology* 150, 3049-3057.
- Bornstein, S. R., Abu-Asab, M., Glasow, A., Path, G., Hauner, H., Tsokos, M., Chrousos, G. P. and Scherbaum, W. A.** (2000). Immunohistochemical and ultrastructural localization of leptin and leptin receptor in human white adipose tissue and differentiating human adipose cells in primary culture. *Diabetes* 49, 532-538.
- Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B. R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Boren, J. et al.** (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* 9, 1286-1293.
- Bostrom, P., Rutberg, M., Ericsson, J., Holmdahl, P., Andersson, L., Frohman, M. A., Boren, J. and Olofsson, S. O.** (2005). Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1945-1951.
- Bouloumie, A., Lolmede, K., Sengenès, C., Galitzky, J. and Lafontan, M.** (2002). Angiogenesis in adipose tissue. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 63, 91-95.
- Boyd, N. L., Park, H., Yi, H., Boo, Y. C., Sorescu, G. P., Sykes, M. and Jo, H.** (2003). Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H1113-H1122.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brake, D. K., Smith, E. O., Mersmann, H., Smith, C. W. and Robker, R. L.** (2006). ICAM-1 expression in adipose tissue: effects of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 291, C1232-C1239.
- Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J. and Londos, C.** (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J. Lipid Res.* 38, 2249-2263.

- Brasaemle, D. L., Dolios, G., Shapiro, L. and Wang, R.** (2004). Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 46835-46842.
- Brasaemle, D. L., Rubin, B., Harten, I. A., Gruia-Gray, J., Kimmel, A. R. and Londos, C.** (2000). Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 275, 38486-38493.
- Briand, N., Dugail, I. and Le, L. S.** (2011a). Cavin proteins: New players in the caveolae field. *Biochimie* 93, 71-77.
- Briand, N., Le, L. S., Sessa, W. C., Ferre, P. and Dugail, I.** (2011b). Distinct roles of endothelial and adipocyte caveolin-1 in macrophage infiltration and adipose tissue metabolic activity. *Diabetes* 60, 448-453.
- Brown, D. A.** (2001). Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr. Biol.* 11, R446-R449.
- Brown, M. S., Goldstein, J. L., Krieger, M., Ho, Y. K. and Anderson, R. G.** (1979). Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins. *J. Cell Biol.* 82, 597-613.
- Bruun, J. M., Lihn, A. S., Pedersen, S. B. and Richelsen, B.** (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 2282-2289.
- Buhman, K. K., Chen, H. C. and Farese, R. V., Jr.** (2001). The enzymes of neutral lipid synthesis. *J. Biol. Chem.* 276, 40369-40372.
- Burgener, R., Wolf, M., Ganz, T. and Baggiolini, M.** (1990). Purification and characterization of a major phosphatidylserine-binding phosphoprotein from human platelets. *Biochem. J.* 269, 729-734.
- Burgermeister, E., Liscovitch, M., Rocken, C., Schmid, R. M. and Ebert, M. P.** (2008). Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett.* 268, 187-201.
- Buschmann, R. J. and Manke, D. J.** (1981). Morphometric analysis of the membranes and organelles of small intestinal enterocytes. II. lipid-fed hamster. *J. Ultrastruct. Res.* 76, 15-26.
- Campbell, L., Hollins, A. J., Al-Eid, A., Newman, G. R., von, R. C. and Gumbleton, M.** (1999). Caveolin-1 expression and caveolae biogenesis during cell transdifferentiation in lung alveolar epithelial primary cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 262, 744-751.
- Cancello, R., Tordjman, J., Poitou, C., Guilhem, G., Bouillot, J. L., Hugol, D., Coussieu, C., Basdevant, A., Bar, H. A., Bedossa, P. et al.** (2006). Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes* 55, 1554-1561.

- Cani, P. D., Amar, J., Iglesias, M. A., Poggi, M., Knauf, C., Bastelica, D., Neyrinck, A. M., Fava, F., Tuohy, K. M., Chabo, C. et al.** (2007). Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 56, 1761-1772.
- Cao, H., Alston, L., Ruschman, J. and Hegele, R. A.** (2008). Heterozygous CAV1 frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 7, 3.
- Cao, Y.** (2007). Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J. Clin. Invest* 117, 2362-2368.
- Carbone, I., Bruno, C., Sotgia, F., Bado, M., Broda, P., Masetti, E., Panella, A., Zara, F., Bricarelli, F. D., Cordone, G. et al.** (2000). Mutation in the CAV3 gene causes partial caveolin-3 deficiency and hyperCKemia. *Neurology* 54, 1373-1376.
- Caspar-Bauguil, S., Cousin, B., Galinier, A., Segafredo, C., Nibbelink, M., Andre, M., Casteilla, L. and Penicaud, L.** (2005). Adipose tissues as an ancestral immune organ: site-specific change in obesity. *FEBS Lett.* 579, 3487-3492.
- Chaineau, M., Danglot, L. and Galli, T.** (2009). Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. *FEBS Lett.* 583, 3817-3826.
- Chang, B. H., Li, L., Paul, A., Taniguchi, S., Nannegari, V., Heird, W. C. and Chan, L.** (2006). Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein. *Mol. Cell Biol.* 26, 1063-1076.
- Charles, M. A., Eschwege, E. and Basdevant, A.** (2008). Monitoring the obesity epidemic in France: the Obepi surveys 1997-2006. *Obesity. (Silver. Spring)* 16, 2182-2186.
- Charo, I. F. and Taubman, M. B.** (2004). Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ. Res.* 95, 858-866.
- Cheng, J., Fujita, A., Ohsaki, Y., Suzuki, M., Shinohara, Y. and Fujimoto, T.** (2009). Quantitative electron microscopy shows uniform incorporation of triglycerides into existing lipid droplets. *Histochem. Cell Biol.* 132, 281-291.
- Cohen, A. W., Combs, T. P., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P.** (2003). Role of caveolin and caveolae in insulin signaling and diabetes. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 285, E1151-E1160.
- Cohen, A. W., Razani, B., Schubert, W., Williams, T. M., Wang, X. B., Iyengar, P., Brasaemle, D. L., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P.** (2004). Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. *Diabetes* 53, 1261-1270.
- Cohen, A. W., Schubert, W., Brasaemle, D. L., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P.** (2005). Caveolin-1 expression is essential for proper nonshivering thermogenesis in brown adipose tissue. *Diabetes* 54, 679-686.
- Cook-Mills, J. M. and Deem, T. L.** (2005). Active participation of endothelial cells in inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 77, 487-495.

- Couet, J., Li, S., Okamoto, T., Ikezu, T. and Lisanti, M. P.** (1997). Identification of peptide and protein ligands for the caveolin-scaffolding domain. Implications for the interaction of caveolin with caveolae-associated proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 6525-6533.
- Cui, J., Rohr, L. R., Swanson, G., Speights, V. O., Maxwell, T. and Brothman, A. R.** (2001). Hypermethylation of the caveolin-1 gene promoter in prostate cancer. *Prostate* 46, 249-256.
- Curat, C. A., Miranville, A., Sengenès, C., Diehl, M., Tonus, C., Busse, R. and Bouloumie, A.** (2004). From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 53, 1285-1292.
- Czarny, M., Lavie, Y., Fiucci, G. and Liscovitch, M.** (1999). Localization of phospholipase D in detergent-insoluble, caveolin-rich membrane domains. Modulation by caveolin-1 expression and caveolin-182-101. *J. Biol. Chem.* 274, 2717-2724.
- Danesch, U., Hoeck, W. and Ringold, G. M.** (1992). Cloning and transcriptional regulation of a novel adipocyte-specific gene, FSP27. CAAT-enhancer-binding protein (C/EBP) and C/EBP-like proteins interact with sequences required for differentiation-dependent expression. *J. Biol. Chem.* 267, 7185-7193.
- Dasari, A., Bartholomew, J. N., Volonte, D. and Galbiati, F.** (2006). Oxidative stress induces premature senescence by stimulating caveolin-1 gene transcription through p38 mitogen-activated protein kinase/Sp1-mediated activation of two GC-rich promoter elements. *Cancer Res.* 66, 10805-10814.
- Deng, Y. and Scherer, P. E.** (2010). Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1212, E1-E19.
- Despres, J. P. and Lemieux, I.** (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 444, 881-887.
- Dietzen, D. J., Hastings, W. R. and Lublin, D. M.** (1995). Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae. *J. Biol. Chem.* 270, 6838-6842.
- Drab, M., Verkade, P., Elger, M., Kasper, M., Lohn, M., Lauterbach, B., Menne, J., Lindschau, C., Mende, F., Luft, F. C. et al.** (2001). Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293, 2449-2452.
- Dulhunty, A. F. and Franzini-Armstrong, C.** (1975). The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *J. Physiol* 250, 513-539.
- Dwianingsih, E. K., Takeshima, Y., Itoh, K., Yamauchi, Y., Awano, H., Malueka, R. G., Nishida, A., Ota, M., Yagi, M. and Matsuo, M.** (2010). A Japanese child with asymptomatic elevation of serum creatine kinase shows PTRF-CAVIN mutation matching with congenital generalized lipodystrophy type 4. *Mol. Genet. Metab* 101, 233-237.

- Echarri, A. and Del Pozo, M. A.** (2006). Caveolae internalization regulates integrin-dependent signaling pathways. *Cell Cycle* 5, 2179-2182.
- Elks, M. L. and Manganiello, V. C.** (1985). Antilipolytic action of insulin: role of cAMP phosphodiesterase activation. *Endocrinology* 116, 2119-2121.
- Engelman, J. A., Wykoff, C. C., Yasuhara, S., Song, K. S., Okamoto, T. and Lisanti, M. P.** (1997). Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. *J. Biol. Chem.* 272, 16374-16381.
- Engelman, J. A., Zhang, X. L. and Lisanti, M. P.** (1998). Genes encoding human caveolin-1 and -2 are co-localized to the D7S522 locus (7q31.1), a known fragile site (FRA7G) that is frequently deleted in human cancers. *FEBS Lett.* 436, 403-410.
- Epand, R. M., Sayer, B. G. and Epand, R. F.** (2005). Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *J. Mol. Biol.* 345, 339-350.
- Eriksson, H., Ridderstrale, M., Degerman, E., Ekholm, D., Smith, C. J., Manganiello, V. C., Belfrage, P. and Tornqvist, H.** (1995). Evidence for the key role of the adipocyte cGMP-inhibited cAMP phosphodiesterase in the antilipolytic action of insulin. *Biochim. Biophys. Acta* 1266, 101-107.
- Erridge, C., Attina, T., Spickett, C. M. and Webb, D. J.** (2007). A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *Am. J. Clin. Nutr.* 86, 1286-1292.
- Fei, W., Shui, G., Zhang, Y., Krahmer, N., Ferguson, C., Kapterian, T. S., Lin, R. C., Dawes, I. W., Brown, A. J., Li, P. et al.** (2011). A role for phosphatidic Acid in the formation of "supersized" lipid droplets. *PLoS. Genet.* 7, e1002201.
- Fernandez, M. A., Albor, C., Ingelmo-Torres, M., Nixon, S. J., Ferguson, C., Kurzchalia, T., Tebar, F., Enrich, C., Parton, R. G. and Pol, A.** (2006). Caveolin-1 is essential for liver regeneration. *Science* 313, 1628-1632.
- Fernandez-Rojo, M. A., Restall, C., Ferguson, C., Martel, N., Martin, S., Bosch, M., Kassan, A., Leong, G. M., Martin, S. D., McGee, S. L. et al.** (2011). Caveolin-1 orchestrates the balance between glucose and lipid-dependent energy metabolism: implications for liver regeneration. *Hepatology*.
- Feron, O., Belhassen, L., Kobzik, L., Smith, T. W., Kelly, R. A. and Michel, T.** (1996). Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 271, 22810-22814.
- Feuerer, M., Herrero, L., Cipolletta, D., Naaz, A., Wong, J., Nayer, A., Lee, J., Goldfine, A. B., Benoist, C., Shoelson, S. et al.** (2009). Lean, but not obese, fat is enriched for a unique population of regulatory T cells that affect metabolic parameters. *Nat. Med.* 15, 930-939.
- Fielding, P. E., Chau, P., Liu, D., Spencer, T. A. and Fielding, C. J.** (2004). Mechanism of platelet-derived growth factor-dependent caveolin-1 phosphorylation: relationship to sterol binding and the role of serine-80. *Biochemistry* 43, 2578-2586.

- Fiucci, G., Ravid, D., Reich, R. and Liscovitch, M.** (2002). Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21, 2365-2375.
- Foti, M., Porcheron, G., Fournier, M., Maeder, C. and Carpentier, J. L.** (2007). The neck of caveolae is a distinct plasma membrane subdomain that concentrates insulin receptors in 3T3-L1 adipocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 1242-1247.
- Fra, A. M., Williamson, E., Simons, K. and Parton, R. G.** (1995). De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8655-8659.
- Fredrikson, G., Stralfors, P., Nilsson, N. O. and Belfrage, P.** (1981). Hormone-sensitive lipase of rat adipose tissue. Purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 256, 6311-6320.
- Frohnert, B. I. and Bernlohr, D. A.** (2000). Regulation of fatty acid transporters in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* 39, 83-107.
- Frye, C. A., Wu, X. and Patrick, C. W.** (2005). Microvascular endothelial cells sustain preadipocyte viability under hypoxic conditions. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim* 41, 160-164.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Ishiguro, K., Tauchi, K. and Nomura, R.** (2001). Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J. Cell Biol.* 152, 1079-1085.
- Fujimoto, T., Kogo, H., Nomura, R. and Une, T.** (2000). Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19, 3509-3517.
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Kinoshita, T., Homma, K. J., Onoduka, J., Mori, M., Yamaguchi, S., Makita, M., Higashi, Y., Yamashita, A. et al.** (2007). Involvement of ACSL in local synthesis of neutral lipids in cytoplasmic lipid droplets in human hepatocyte HuH7. *J. Lipid Res.* 48, 1280-1292.
- Fujimoto, Y., Itabe, H., Sakai, J., Makita, M., Noda, J., Mori, M., Higashi, Y., Kojima, S. and Takano, T.** (2004). Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim. Biophys. Acta* 1644, 47-59.
- Galbiati, F., Engelman, J. A., Volonte, D., Zhang, X. L., Minetti, C., Li, M., Hou, H., Jr., Kneitz, B., Edelmann, W. and Lisanti, M. P.** (2001a). Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin-glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 21425-21433.
- Galbiati, F., Razani, B. and Lisanti, M. P.** (2001b). Caveolae and caveolin-3 in muscular dystrophy. *Trends Mol. Med.* 7, 435-441.
- Galbiati, F., Volonte, D., Liu, J., Capozza, F., Frank, P. G., Zhu, L., Pestell, R. G. and Lisanti, M. P.** (2001c). Caveolin-1 expression negatively regulates cell cycle progression by inducing G(0)/G(1) arrest via a p53/p21(WAF1/Cip1)-dependent mechanism. *Mol. Biol. Cell* 12, 2229-2244.

- Galic, S., Oakhill, J. S. and Steinberg, G. R.** (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol. Cell Endocrinol.* 316, 129-139.
- Garcia-Cardena, G., Fan, R., Stern, D. F., Liu, J. and Sessa, W. C.** (1996a). Endothelial nitric oxide synthase is regulated by tyrosine phosphorylation and interacts with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 271, 27237-27240.
- Garcia-Cardena, G., Oh, P., Liu, J., Schnitzer, J. E. and Sessa, W. C.** (1996b). Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 6448-6453.
- Gaudreault, S. B., Chabot, C., Gratton, J. P. and Poirier, J.** (2004). The caveolin scaffolding domain modifies 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate receptor binding properties by inhibiting phospholipase A2 activity. *J. Biol. Chem.* 279, 356-362.
- Gkantiragas, I., Brugger, B., Stuken, E., Kaloyanova, D., Li, X. Y., Lohr, K., Lottspeich, F., Wieland, F. T. and Helms, J. B.** (2001). Sphingomyelin-enriched microdomains at the Golgi complex. *Mol. Biol. Cell* 12, 1819-1833.
- Glenney, J. R., Jr.** (1989). Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 264, 20163-20166.
- Goetz, J. G., Minguet, S., Navarro-Lerida, I., Lazcano, J. J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibanez, T., Pellinen, T., Echarri, A. et al.** (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* 146, 148-163.
- Gong, J., Sun, Z., Wu, L., Xu, W., Schieber, N., Xu, D., Shui, G., Yang, H., Parton, R. G. and Li, P.** (2011). Fsp27 promotes lipid droplet growth by lipid exchange and transfer at lipid droplet contact sites. *J. Cell Biol.*
- Goodman, J. M.** (2008). The gregarious lipid droplet. *J. Biol. Chem.* 283, 28005-28009.
- Gould, M. L., Williams, G. and Nicholson, H. D.** (2010). Changes in caveolae, caveolin, and polymerase 1 and transcript release factor (PTRF) expression in prostate cancer progression. *Prostate* 70, 1609-1621.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Granneman, R. L., Greenberg, A. S., Obin, M. S. and Zhu, Z.** (2007). Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 5726-5735.
- Granneman, J. G., Moore, H. P., Krishnamoorthy, R. and Rathod, M.** (2009). Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl). *J. Biol. Chem.* 284, 34538-34544.
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A., Garty, N. B., Blanchette-Mackie, E. J. and Londos, C.** (1991). Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J. Biol. Chem.* 266, 11341-11346.

- Guglieri, M., Magri, F., D'Angelo, M. G., Prella, A., Morandi, L., Rodolico, C., Cagliani, R., Mora, M., Fortunato, F., Bordoni, A. et al.** (2008). Clinical, molecular, and protein correlations in a large sample of genetically diagnosed Italian limb girdle muscular dystrophy patients. *Hum. Mutat.* 29, 258-266.
- Guo, Y., Walther, T. C., Rao, M., Stuurman, N., Goshima, G., Terayama, K., Wong, J. S., Vale, R. D., Walter, P. and Farese, R. V.** (2008). Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature* 453, 657-661.
- Gustavsson, J., Parpal, S., Karlsson, M., Ramsing, C., Thorn, H., Borg, M., Lindroth, M., Peterson, K. H., Magnusson, K. E. and Stralfors, P.** (1999). Localization of the insulin receptor in caveolae of adipocyte plasma membrane. *FASEB J.* 13, 1961-1971.
- Gustincich, S. and Schneider, C.** (1993). Serum deprivation response gene is induced by serum starvation but not by contact inhibition. *Cell Growth Differ.* 4, 753-760.
- Gustincich, S., Vatta, P., Goruppi, S., Wolf, M., Saccone, S., Della, V. G., Baggiolini, M. and Schneider, C.** (1999). The human serum deprivation response gene (SDPR) maps to 2q32-q33 and codes for a phosphatidylserine-binding protein. *Genomics* 57, 120-129.
- Haemmerle, G., Lass, A., Zimmermann, R., Gorkiewicz, G., Meyer, C., Rozman, J., Heldmaier, G., Maier, R., Theussl, C., Eder, S. et al.** (2006). Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. *Science* 312, 734-737.
- Haemmerle, G., Zimmermann, R., Hayn, M., Theussl, C., Waeg, G., Wagner, E., Sattler, W., Magin, T. M., Wagner, E. F. and Zechner, R.** (2002). Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes diglyceride accumulation in adipose tissue, muscle, and testis. *J. Biol. Chem.* 277, 4806-4815.
- Hagiwara, Y., Nishina, Y., Yorifuji, H. and Kikuchi, T.** (2002). Immunolocalization of caveolin-1 and caveolin-3 in monkey skeletal, cardiac and uterine smooth muscles. *Cell Struct. Funct.* 27, 375-382.
- Hagiwara, Y., Sasaoka, T., Araishi, K., Imamura, M., Yorifuji, H., Nonaka, I., Ozawa, E. and Kikuchi, T.** (2000). Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9, 3047-3054.
- Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M. E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A. D., Sherwani, S., Wang, Z. V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U. J. et al.** (2009). Hypoxia-inducible factor 1alpha induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol. Cell Biol.* 29, 4467-4483.
- Hansen, C. G., Bright, N. A., Howard, G. and Nichols, B. J.** (2009). SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat. Cell Biol.* 11, 807-814.
- Harada, K., Shen, W. J., Patel, S., Natu, V., Wang, J., Osuga, J., Ishibashi, S. and Kraemer, F. B.** (2003). Resistance to high-fat diet-induced obesity and altered expression of adipose-specific genes in HSL-deficient mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab* 285, E1182-E1195.

- Harris, J., Werling, D., Koss, M., Monaghan, P., Taylor, G. and Howard, C. J.** (2002). Expression of caveolin by bovine lymphocytes and antigen-presenting cells. *Immunology* 105, 190-195.
- Havel, R. J.** (1997). Postprandial lipid metabolism: an overview. *Proc. Nutr. Soc.* 56, 659-666.
- Hayashi, K., Matsuda, S., Machida, K., Yamamoto, T., Fukuda, Y., Nimura, Y., Hayakawa, T. and Hamaguchi, M.** (2001). Invasion activating caveolin-1 mutation in human scirrhous breast cancers. *Cancer Res.* 61, 2361-2364.
- Hayashi, Y. K., Matsuda, C., Ogawa, M., Goto, K., Tominaga, K., Mitsuhashi, S., Park, Y. E., Nonaka, I., Hino-Fukuyo, N., Haginoya, K. et al.** (2009). Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J. Clin. Invest* 119, 2623-2633.
- Hayer, A., Stoeber, M., Bissig, C. and Helenius, A.** (2010a). Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic*. 11, 361-382.
- Hayer, A., Stoeber, M., Ritz, D., Engel, S., Meyer, H. H. and Helenius, A.** (2010b). Caveolin-1 is ubiquitinated and targeted to intraluminal vesicles in endolysosomes for degradation. *J. Cell Biol.* 191, 615-629.
- He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B.** (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses
7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 2509-2514.
- Herrero, L., Shapiro, H., Nayer, A., Lee, J. and Shoelson, S. E.** (2010). Inflammation and adipose tissue macrophages in lipodystrophic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 240-245.
- Hill, M. M., Bastiani, M., Luetterforst, R., Kirkham, M., Kirkham, A., Nixon, S. J., Walser, P., Abankwa, D., Oorschot, V. M., Martin, S. et al.** (2008). PTRF-Cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132, 113-124.
- Himms-Hagen, J., Melnyk, A., Zingaretti, M. C., Ceresi, E., Barbatelli, G. and Cinti, S.** (2000). Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C670-C681.
- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M. and Hotamisligil, G. S.** (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Holland, W. L. and Summers, S. A.** (2008). Sphingolipids, insulin resistance, and metabolic disease: new insights from in vivo manipulation of sphingolipid metabolism. *Endocr. Rev.* 29, 381-402.
- HOLLENBERG, C. H., RABEN, M. S. and ASTWOOD, E. B.** (1961). The lipolytic response to corticotropin. *Endocrinology* 68, 589-598.

- Horl, G., Wagner, A., Cole, L. K., Malli, R., Reicher, H., Kotzbeck, P., Kofeler, H., Hofler, G., Frank, S., Bogner-Strauss, J. G. et al.** (2011). Sequential synthesis and methylation of phosphatidylethanolamine promote lipid droplet biosynthesis and stability in tissue culture and in vivo. *J. Biol. Chem.* 286, 17338-17350.
- Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M. et al.** (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56, 901-911.
- Hue-Beauvais, C., Pechoux, C., Bouguyon, E., Chat, S., Truchet, S., Pauloin, A., Le, G. Y. and Ollivier-Bousquet, M.** (2007). Localisation of caveolin in mammary tissue depends on cell type. *Cell Tissue Res.* 328, 521-536.
- Hulit, J., Bash, T., Fu, M., Galbiati, F., Albanese, C., Sage, D. R., Schlegel, A., Zhurinsky, J., Shtutman, M., Ben-Ze'ev, A. et al.** (2000). The cyclin D1 gene is transcriptionally repressed by caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 275, 21203-21209.
- Jambunathan, S., Yin, J., Khan, W., Tamori, Y. and Puri, V.** (2011). FSP27 Promotes Lipid Droplet Clustering and Then Fusion to Regulate Triglyceride Accumulation. *PLoS. One.* 6, e28614.
- Jenkins, C. M., Mancuso, D. J., Yan, W., Sims, H. F., Gibson, B. and Gross, R. W.** (2004). Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J. Biol. Chem.* 279, 48968-48975.
- Johnson, J. A., Albu, J. B., Engelson, E. S., Fried, S. K., Inada, Y., Ionescu, G. and Kotler, D. P.** (2004). Increased systemic and adipose tissue cytokines in patients with HIV-associated lipodystrophy. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 286, E261-E271.
- Kanda, H., Tateya, S., Tamori, Y., Kotani, K., Hiasa, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Miyachi, H., Maeda, S., Egashira, K. et al.** (2006). MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J. Clin. Invest* 116, 1494-1505.
- Kandror, K. V., Stephens, J. M. and Pilch, P. F.** (1995). Expression and compartmentalization of caveolin in adipose cells: coordinate regulation with and structural segregation from GLUT4. *J. Cell Biol.* 129, 999-1006.
- Karelis, A. D., Faraj, M., Bastard, J. P., St-Pierre, D. H., Brochu, M., Prud'homme, D. and Rabasa-Lhoret, R.** (2005). The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 90, 4145-4150.
- Kim, C. A., Delepine, M., Boutet, E., El, M. H., Le, L. S., Meier, M., Nemani, M., Bridel, E., Leite, C. C., Bertola, D. R. et al.** (2008). Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 93, 1129-1134.
- Kimmel, A. R., Brasaemle, D. L., McAndrews-Hill, M., Sztalryd, C. and Londos, C.** (2010). Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. *J. Lipid Res.* 51, 468-471.

- Kimura, A., Mora, S., Shigematsu, S., Pessin, J. E. and Saltiel, A. R.** (2002). The insulin receptor catalyzes the tyrosine phosphorylation of caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 277, 30153-30158.
- Kirkham, M., Nixon, S. J., Howes, M. T., Abi-Rached, L., Wakeham, D. E., Hanzal-Bayer, M., Ferguson, C., Hill, M. M., Fernandez-Rojo, M., Brown, D. A. et al.** (2008). Evolutionary analysis and molecular dissection of caveola biogenesis. *J. Cell Sci.* 121, 2075-2086.
- Koleske, A. J., Baltimore, D. and Lisanti, M. P.** (1995). Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1381-1385.
- Kozera, L., White, E. and Calaghan, S.** (2009). Caveolae act as membrane reserves which limit mechanosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte. *PLoS. One.* 4, e8312.
- Krahmer, N., Guo, Y., Wilfling, F., Hilger, M., Lingrell, S., Heger, K., Newman, H. W., Schmidt-Supprian, M., Vance, D. E., Mann, M. et al.** (2011). Phosphatidylcholine Synthesis for Lipid Droplet Expansion Is Mediated by Localized Activation of CTP:Phosphocholine Cytidyltransferase. *Cell Metab* 14, 504-515.
- Kuerschner, L., Moessinger, C. and Thiele, C.** (2008). Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic.* 9, 338-352.
- Kunze, E., Von, B. F., Werner, C., Wendt, M. and Schlott, T.** (2006). Transitional cell carcinomas and nonurothelial carcinomas of the urinary bladder differ in the promoter methylation status of the caveolin-1, hDAB2IP and p53 genes, but not in the global methylation of Alu elements. *Int. J. Mol. Med.* 17, 3-13.
- Kurzchalia, T. V., Dupree, P., Parton, R. G., Kellner, R., Virta, H., Lehnert, M. and Simons, K.** (1992). VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* 118, 1003-1014.
- Lacy-Hulbert, A. and Moore, K. J.** (2006). Designer macrophages: oxidative metabolism fuels inflammation repair. *Cell Metab* 4, 7-8.
- Lagathu, C., Eustace, B., Prot, M., Frantz, D., Gu, Y., Bastard, J. P., Maachi, M., Azoulay, S., Briggs, M., Caron, M. et al.** (2007). Some HIV antiretrovirals increase oxidative stress and alter chemokine, cytokine or adiponectin production in human adipocytes and macrophages. *Antivir. Ther.* 12, 489-500.
- Lahtinen, U., Honsho, M., Parton, R. G., Simons, K. and Verkade, P.** (2003). Involvement of caveolin-2 in caveolar biogenesis in MDCK cells. *FEBS Lett.* 538, 85-88.
- Lass, A., Zimmermann, R., Haemmerle, G., Riederer, M., Schoiswohl, G., Schweiger, M., Kienesberger, P., Strauss, J. G., Gorkiewicz, G. and Zechner, R.** (2006). Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab* 3, 309-319.
- Le Lay, S., Blouin, C. M., Hajduch, E. and Dugail, I.** (2009). Filling up adipocytes with lipids. Lessons from caveolin-1 deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 514-518.

- Le Lay, S., Briand, N., Blouin, C. M., Chateau, D., Prado, C., Lasnier, F., Le, L., X, Hajduch, E. and Dugail, I.** (2010). The lipotrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes. *Autophagy*. 6, 754-763.
- Le Lay, S., Hajduch, E., Lindsay, M. R., Le, L., X, Thiele, C., Ferre, P., Parton, R. G., Kurzchalia, T., Simons, K. and Dugail, I.** (2006). Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic*. 7, 549-561.
- Lee, H., Volonte, D., Galbiati, F., Iyengar, P., Lublin, D. M., Bregman, D. B., Wilson, M. T., Campos-Gonzalez, R., Bouzahzah, B., Pestell, R. G. et al.** (2000). Constitutive and growth factor-regulated phosphorylation of caveolin-1 occurs at the same site (Tyr-14) in vivo: identification of a c-Src/Cav-1/Grb7 signaling cassette. *Mol. Endocrinol.* 14, 1750-1775.
- Lee, S. W., Reimer, C. L., Oh, P., Campbell, D. B. and Schnitzer, J. E.** (1998). Tumor cell growth inhibition by caveolin re-expression in human breast cancer cells. *Oncogene* 16, 1391-1397.
- Li, S., Galbiati, F., Volonte, D., Sargiacomo, M., Engelman, J. A., Das, K., Scherer, P. E. and Lisanti, M. P.** (1998). Mutational analysis of caveolin-induced vesicle formation. Expression of caveolin-1 recruits caveolin-2 to caveolae membranes. *FEBS Lett.* 434, 127-134.
- Li, T., Sotgia, F., Vuolo, M. A., Li, M., Yang, W. C., Pestell, R. G., Sparano, J. A. and Lisanti, M. P.** (2006). Caveolin-1 mutations in human breast cancer: functional association with estrogen receptor alpha-positive status. *Am. J. Pathol.* 168, 1998-2013.
- Li, X., Jia, Z., Shen, Y., Ichikawa, H., Jarvik, J., Nagele, R. G. and Goldberg, G. S.** (2008). Coordinate suppression of Sdpr and Fhl1 expression in tumors of the breast, kidney, and prostate. *Cancer Sci.* 99, 1326-1333.
- Lisanti, M. P., Scherer, P. E., Vidugiriene, J., Tang, Z., Hermanowski-Vosatka, A., Tu, Y. H., Cook, R. F. and Sargiacomo, M.** (1994). Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* 126, 111-126.
- Liu, L., Brown, D., McKee, M., Lebrasseur, N. K., Yang, D., Albrecht, K. H., Ravid, K. and Pilch, P. F.** (2008). Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab* 8, 310-317.
- Liu, L. and Pilch, P. F.** (2008). A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J. Biol. Chem.* 283, 4314-4322.
- Lolmede, K., Durand de, S. F., V, Galitzky, J., Lafontan, M. and Bouloumie, A.** (2003). Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* 27, 1187-1195.
- Londos, C., Brasaemle, D. L., Schultz, C. J., Segrest, J. P. and Kimmel, A. R.** (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 51-58.

- Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R.** (2007). Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest* 117, 175-184.
- Lumeng, C. N., DelProposto, J. B., Westcott, D. J. and Saltiel, A. R.** (2008). Phenotypic switching of adipose tissue macrophages with obesity is generated by spatiotemporal differences in macrophage subtypes. *Diabetes* 57, 3239-3246.
- Maeda, K., Cao, H., Kono, K., Gorgun, C. Z., Furuhashi, M., Uysal, K. T., Cao, Q., Atsumi, G., Malone, H., Krishnan, B. et al.** (2005). Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes
1. *Cell Metab* 1, 107-119.
- Magre, J., Delepine, M., Khallouf, E., Gedde-Dahl, T., Jr., Van, M. L., Sobel, E., Papp, J., Meier, M., Megarbane, A., Bachy, A. et al.** (2001). Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat. Genet.* 28, 365-370.
- Marchiando, A. M., Shen, L., Graham, W. V., Weber, C. R., Schwarz, B. T., Austin, J. R., Raleigh, D. R., Guan, Y., Watson, A. J., Montrose, M. H. et al.** (2010). Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo. *J. Cell Biol.* 189, 111-126.
- Martinez-Botas, J., Anderson, J. B., Tessier, D., Lapillonne, A., Chang, B. H., Quast, M. J., Gorenstein, D., Chen, K. H. and Chan, L.** (2000). Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr*(db/db) mice. *Nat. Genet.* 26, 474-479.
- Masserini, M., Palestini, P. and Pitto, M.** (1999). Glycolipid-enriched caveolae and caveolae-like domains in the nervous system. *J. Neurochem.* 73, 1-11.
- Mastick, C. C., Brady, M. J. and Saltiel, A. R.** (1995). Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell Biol.* 129, 1523-1531.
- Matsusue, K., Kusakabe, T., Noguchi, T., Takiguchi, S., Suzuki, T., Yamano, S. and Gonzalez, F. J.** (2008). Hepatic steatosis in leptin-deficient mice is promoted by the PPARgamma target gene *Fsp27*. *Cell Metab* 7, 302-311.
- Mattsson, C. L., Andersson, E. R. and Nedergaard, J.** (2010). Differential involvement of caveolin-1 in brown adipocyte signaling: impaired beta3-adrenergic, but unaffected LPA, PDGF and EGF receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 983-989.
- Mayoral, R., Fernandez-Martinez, A., Roy, R., Bosca, L. and Martin-Sanz, P.** (2007). Dispensability and dynamics of caveolin-1 during liver regeneration and in isolated hepatic cells. *Hepatology* 46, 813-822.
- Mayoral, R., Valverde, A. M., Llorente, I. C., Gonzalez-Rodriguez, A., Bosca, L. and Martin-Sanz, P.** (2010). Impairment of transforming growth factor beta signaling in caveolin-1-deficient hepatocytes: role in liver regeneration
1. *J. Biol Chem.* 285, 3633-3642.
- McFie, P. J., Banman, S. L., Kary, S. and Stone, S. J.** (2011). Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid

- droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 286, 28235-28246.
- McMahon, K. A., Zajicek, H., Li, W. P., Peyton, M. J., Minna, J. D., Hernandez, V. J., Luby-Phelps, K. and Anderson, R. G.** (2009). SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J.* 28, 1001-1015.
- Meshulam, T., Breen, M. R., Liu, L., Parton, R. G. and Pilch, P. F.** (2011). Caveolins/caveolae protect adipocytes from fatty acid-mediated lipotoxicity. *J. Lipid Res.* 52, 1526-1532.
- Mineo, C., Ying, Y. S., Chapline, C., Jaken, S. and Anderson, R. G.** (1998). Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J. Cell Biol.* 141, 601-610.
- Minetti, C., Bado, M., Broda, P., Sotgia, F., Bruno, C., Galbiati, F., Volonte, D., Lucania, G., Pavan, A., Bonilla, E. et al.** (2002). Impairment of caveolae formation and T-system disorganization in human muscular dystrophy with caveolin-3 deficiency. *Am. J. Pathol.* 160, 265-270.
- Minetti, C., Sotgia, F., Bruno, C., Scartezzini, P., Broda, P., Bado, M., Masetti, E., Mazzocco, M., Egeo, A., Donati, M. A. et al.** (1998). Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18, 365-368.
- Minshall, R. D., Tiruppathi, C., Vogel, S. M., Niles, W. D., Gilchrist, A., Hamm, H. E. and Malik, A. B.** (2000). Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J. Cell Biol.* 150, 1057-1070.
- Miyoshi, H., Perfield, J. W., Souza, S. C., Shen, W. J., Zhang, H. H., Stancheva, Z. S., Kraemer, F. B., Obin, M. S. and Greenberg, A. S.** (2007). Control of adipose triglyceride lipase action by serine 517 of perilipin A globally regulates protein kinase A-stimulated lipolysis in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 996-1002.
- Miyoshi, H., Souza, S. C., Endo, M., Sawada, T., Perfield, J. W., Shimizu, C., Stancheva, Z., Nagai, S., Strissel, K. J., Yoshioka, N. et al.** (2010). Perilipin overexpression in mice protects against diet-induced obesity
2. *J. Lipid Res* 51, 975-982.
- Moessinger, C., Kuerschner, L., Spandl, J., Shevchenko, A. and Thiele, C.** (2011). Human lysophosphatidylcholine acyltransferases 1 and 2 are located in lipid droplets where they catalyze the formation of phosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 286, 21330-21339.
- Montesano, R., Roth, J., Robert, A. and Orci, L.** (1982). Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature* 296, 651-653.
- Moon, K. C., Lee, G. K., Yoo, S. H., Jeon, Y. K., Chung, J. H., Han, J. and Chung, D. H.** (2005). Expression of caveolin-1 in pleomorphic carcinoma of the lung is correlated with a poor prognosis. *Anticancer Res.* 25, 4631-4637.

- Mora, R., Bonilha, V. L., Marmorstein, A., Scherer, P. E., Brown, D., Lisanti, M. P. and Rodriguez-Boulan, E.** (1999). Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1. *J. Biol. Chem.* 274, 25708-25717.
- Mosser, D. M.** (2003). The many faces of macrophage activation. *J. Leukoc. Biol.* 73, 209-212.
- Mottillo, E. P., Shen, X. J. and Granneman, J. G.** (2007). Role of hormone-sensitive lipase in beta-adrenergic remodeling of white adipose tissue. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 293, E1188-E1197.
- Murata, M., Peranen, J., Schreiner, R., Wieland, F., Kurzchalia, T. V. and Simons, K.** (1995). VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 10339-10343.
- Murphy, D. J.** (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog. Lipid Res.* 40, 325-438.
- Murphy, D. J. and Vance, J.** (1999). Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem. Sci.* 24, 109-115.
- Murphy, S., Martin, S. and Parton, R. G.** (2010). Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens. *PLoS. One.* 5, e15030.
- Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S. et al.** (2009). CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat. Med.* 15, 914-920.
- Nishino, N., Tamori, Y., Tateya, S., Kawaguchi, T., Shibakusa, T., Mizunoya, W., Inoue, K., Kitazawa, R., Kitazawa, S., Matsuki, Y. et al.** (2008). FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets. *J. Clin. Invest* 118, 2808-2821.
- Nystrom, F. H., Chen, H., Cong, L. N., Li, Y. and Quon, M. J.** (1999). Caveolin-1 interacts with the insulin receptor and can differentially modulate insulin signaling in transfected Cos-7 cells and rat adipose cells. *Mol. Endocrinol.* 13, 2013-2024.
- Oh, P., McIntosh, D. P. and Schnitzer, J. E.** (1998). Dynamin at the neck of caveolae mediates their budding to form transport vesicles by GTP-driven fission from the plasma membrane of endothelium. *J. Cell Biol.* 141, 101-114.
- Ong, J. M., Kirchgessner, T. G., Schotz, M. C. and Kern, P. A.** (1988). Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. *J. Biol. Chem.* 263, 12933-12938.
- Ost, A., Ortegren, U., Gustavsson, J., Nystrom, F. H. and Stralfors, P.** (2005). Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 5-8.

- Ostermeyer, A. G., Paci, J. M., Zeng, Y., Lublin, D. M., Munro, S. and Brown, D. A.** (2001). Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J. Cell Biol.* 152, 1071-1078.
- Osuga, J., Ishibashi, S., Oka, T., Yagyu, H., Tozawa, R., Fujimoto, A., Shionoiri, F., Yahagi, N., Kraemer, F. B., Tsutsumi, O. et al.** (2000). Targeted disruption of hormone-sensitive lipase results in male sterility and adipocyte hypertrophy, but not in obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 787-792.
- Otsu, K., Toya, Y., Oshikawa, J., Kurotani, R., Yazawa, T., Sato, M., Yokoyama, U., Umemura, S., Minamisawa, S., Okumura, S. et al.** (2010). Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 298, C450-C456.
- Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I. and Marcel, Y. L.** (2011). Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metab* 13, 655-667.
- Palade, G. E.** (1953). Fine structure of blood capillaries. *Journal of Applied Physics* 24, 1424.
- Park, D. S., Lee, H., Frank, P. G., Razani, B., Nguyen, A. V., Parlow, A. F., Russell, R. G., Hult, J., Pestell, R. G. and Lisanti, M. P.** (2002). Caveolin-1-deficient mice show accelerated mammary gland development during pregnancy, premature lactation, and hyperactivation of the Jak-2/STAT5a signaling cascade. *Mol. Biol. Cell* 13, 3416-3430.
- Park, D. S., Lee, H., Riedel, C., Hult, J., Scherer, P. E., Pestell, R. G. and Lisanti, M. P.** (2001). Prolactin negatively regulates caveolin-1 gene expression in the mammary gland during lactation, via a Ras-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 276, 48389-48397.
- Parker, S., Peterkin, H. S. and Baylis, H. A.** (2007). Muscular dystrophy associated mutations in caveolin-1 induce neurotransmission and locomotion defects in *Caenorhabditis elegans*. *Invert. Neurosci.* 7, 157-164.
- Parolini, I., Sargiacomo, M., Galbiati, F., Rizzo, G., Grignani, F., Engelman, J. A., Okamoto, T., Ikezu, T., Scherer, P. E., Mora, R. et al.** (1999). Expression of caveolin-1 is required for the transport of caveolin-2 to the plasma membrane. Retention of caveolin-2 at the level of the golgi complex. *J. Biol. Chem.* 274, 25718-25725.
- Parton, R. G., Joggerst, B. and Simons, K.** (1994). Regulated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* 127, 1199-1215.
- Parton, R. G. and Simons, K.** (2007). The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 185-194.
- Patani, N., Lambros, M. B., Natrajan, R., Dedes, K. J., Geyer, F. C., Ward, E., Martin, L. A., Dowsett, M. and Reis-Filho, J. S.** (2011). Non-existence of caveolin-1 gene mutations in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.*

- Pessin, J. E. and Saltiel, A. R.** (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest* 106, 165-169.
- Picard, F., Naimi, N., Richard, D. and Deshaies, Y.** (1999). Response of adipose tissue lipoprotein lipase to the cephalic phase of insulin secretion. *Diabetes* 48, 452-459.
- Ploegh, H. L.** (2007). A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* 448, 435-438.
- Pol, A., Luetterforst, R., Lindsay, M., Heino, S., Ikonen, E. and Parton, R. G.** (2001). A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J. Cell Biol.* 152, 1057-1070.
- Pol, A., Martin, S., Fernandez, M. A., Ingelmo-Torres, M., Ferguson, C., Enrich, C. and Parton, R. G.** (2005). Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell* 16, 2091-2105.
- Prattes, S., Horl, G., Hammer, A., Blaschitz, A., Graier, W. F., Sattler, W., Zechner, R. and Steyrer, E.** (2000). Intracellular distribution and mobilization of unesterified cholesterol in adipocytes: triglyceride droplets are surrounded by cholesterol-rich ER-like surface layer structures. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 17), 2977-2989.
- Predescu, S. A., Predescu, D. N., Timblin, B. K., Stan, R. V. and Malik, A. B.** (2003). Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* 14, 4997-5010.
- Puri, V., Konda, S., Ranjit, S., Aouadi, M., Chawla, A., Chouinard, M., Chakladar, A. and Czech, M. P.** (2007). Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet protein that enhances triglyceride storage. *J. Biol. Chem.* 282, 34213-34218.
- Puri, V., Virbasius, J. V., Guilherme, A. and Czech, M. P.** (2008). RNAi screens reveal novel metabolic regulators: RIP140, MAP4k4 and the lipid droplet associated fat specific protein (FSP) 27. *Acta Physiol (Oxf)* 192, 103-115.
- Rajab, A., Straub, V., McCann, L. J., Seelow, D., Varon, R., Barresi, R., Schulze, A., Lucke, B., Lutzkendorf, S., Karbasiyan, M. et al.** (2010). Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. *PLoS. Genet.* 6, e1000874.
- Rajala, M. W. and Scherer, P. E.** (2003). Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology* 144, 3765-3773.
- Ravid, D., Maor, S., Werner, H. and Liscovitch, M.** (2005). Caveolin-1 inhibits cell detachment-induced p53 activation and anoikis by upregulation of insulin-like growth factor-I receptors and signaling. *Oncogene* 24, 1338-1347.
- Razani, B., Combs, T. P., Wang, X. B., Frank, P. G., Park, D. S., Russell, R. G., Li, M., Tang, B., Jelicks, L. A., Scherer, P. E. et al.** (2002a). Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277, 8635-8647.

- Razani, B., Engelman, J. A., Wang, X. B., Schubert, W., Zhang, X. L., Marks, C. B., Macaluso, F., Russell, R. G., Li, M., Pestell, R. G. et al.** (2001). Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276, 38121-38138.
- Razani, B. and Lisanti, M. P.** (2001). Two distinct caveolin-1 domains mediate the functional interaction of caveolin-1 with protein kinase A. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 281, C1241-C1250.
- Razani, B., Wang, X. B., Engelman, J. A., Battista, M., Lagaud, G., Zhang, X. L., Kneitz, B., Hou, H., Jr., Christ, G. J., Edelmann, W. et al.** (2002b). Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol. Cell Biol.* 22, 2329-2344.
- Razani, B., Woodman, S. E. and Lisanti, M. P.** (2002c). Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol. Rev.* 54, 431-467.
- Renou, J. P., Bierie, B., Miyoshi, K., Cui, Y., Djiane, J., Reichenstein, M., Shani, M. and Hennighausen, L.** (2003). Identification of genes differentially expressed in mouse mammary epithelium transformed by an activated beta-catenin. *Oncogene* 22, 4594-4610.
- Repetto, S., Bado, M., Broda, P., Lucania, G., Masetti, E., Sotgia, F., Carbone, I., Pavan, A., Bonilla, E., Cordone, G. et al.** (1999). Increased number of caveolae and caveolin-3 overexpression in Duchenne muscular dystrophy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 547-550.
- Ring, A., Le, L. S., Pohl, J., Verkade, P. and Stremmel, W.** (2006). Caveolin-1 is required for fatty acid translocase (FAT/CD36) localization and function at the plasma membrane of mouse embryonic fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 416-423.
- Robenek, H., Buers, I., Robenek, M. J., Hofnagel, O., Ruebel, A., Troyer, D. and Severs, N. J.** (2011). Topography of lipid droplet-associated proteins: insights from freeze-fracture replica immunogold labeling. *J. Lipids* 2011, 409371.
- Rothberg, K. G., Heuser, J. E., Donzell, W. C., Ying, Y. S., Glenney, J. R. and Anderson, R. G.** (1992). Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673-682.
- Rubio-Cabezas, O., Puri, V., Murano, I., Saudek, V., Semple, R. K., Dash, S., Hyden, C. S., Bottomley, W., Vigouroux, C., Magre, J. et al.** (2009). Partial lipodystrophy and insulin resistant diabetes in a patient with a homozygous nonsense mutation in CIDEA. *EMBO Mol. Med.* 1, 280-287.
- Rupnick, M. A., Panigrahy, D., Zhang, C. Y., Dallabrida, S. M., Lowell, B. B., Langer, R. and Folkman, M. J.** (2002). Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 10730-10735.
- Samuel, V. T., Petersen, K. F. and Shulman, G. I.** (2010). Lipid-induced insulin resistance: unravelling the mechanism
1. *Lancet* 375, 2267-2277.

- Sanguinetti, A. R. and Mastick, C. C.** (2003). c-Abl is required for oxidative stress-induced phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine 14. *Cell Signal.* 15, 289-298.
- Sargiacomo, M., Sudol, M., Tang, Z. and Lisanti, M. P.** (1993). Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell Biol.* 122, 789-807.
- Sartipy, P. and Loskutoff, D. J.** (2003). Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7265-7270.
- Satoh, T., Yang, G., Egawa, S., Addai, J., Frolov, A., Kuwao, S., Timme, T. L., Baba, S. and Thompson, T. C.** (2003). Caveolin-1 expression is a predictor of recurrence-free survival in pT2N0 prostate carcinoma diagnosed in Japanese patients. *Cancer* 97, 1225-1233.
- Scherer, P. E., Lisanti, M. P., Baldini, G., Sargiacomo, M., Mastick, C. C. and Lodish, H. F.** (1994). Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J. Cell Biol.* 127, 1233-1243.
- Schlegel, A., Arvan, P. and Lisanti, M. P.** (2001). Caveolin-1 binding to endoplasmic reticulum membranes and entry into the regulated secretory pathway are regulated by serine phosphorylation. Protein sorting at the level of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 276, 4398-4408.
- Schubert, W., Frank, P. G., Razani, B., Park, D. S., Chow, C. W. and Lisanti, M. P.** (2001). Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J. Biol. Chem.* 276, 48619-48622.
- Schubert, W., Frank, P. G., Woodman, S. E., Hyogo, H., Cohen, D. E., Chow, C. W. and Lisanti, M. P.** (2002). Microvascular hyperpermeability in caveolin-1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric-oxide synthase inhibitor, L-NAME, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. *J. Biol. Chem.* 277, 40091-40098.
- Schwab, W., Galbiati, F., Volonte, D., Hempel, U., Wenzel, K. W., Funk, R. H., Lisanti, M. P. and Kasper, M.** (1999). Characterisation of caveolins from cartilage: expression of caveolin-1, -2 and -3 in chondrocytes and in alginate cell culture of the rat tibia. *Histochem. Cell Biol.* 112, 41-49.
- Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R. and Zimmermann, R.** (2006). Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism. *J. Biol. Chem.* 281, 40236-40241.
- Senoo, H.** (2004). Structure and function of hepatic stellate cells. *Med. Electron Microsc.* 37, 3-15.
- Sens, P. and Turner, M. S.** (2006). Budded membrane microdomains as tension regulators. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* 73, 031918.

- Servetnick, D. A., Brasaemle, D. L., Gruia-Gray, J., Kimmel, A. R., Wolff, J. and Londos, C.** (1995). Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J. Biol. Chem.* 270, 16970-16973.
- Shajahan, A. N., Timblin, B. K., Sandoval, R., Tiruppathi, C., Malik, A. B. and Minshall, R. D.** (2004a). Role of Src-induced dynamin-2 phosphorylation in caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 20392-20400.
- Shajahan, A. N., Tiruppathi, C., Smrcka, A. V., Malik, A. B. and Minshall, R. D.** (2004b). Gbetagamma activation of Src induces caveolae-mediated endocytosis in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 279, 48055-48062.
- Shastri, S., Delgado, M. R., Dirik, E., Turkmen, M., Agarwal, A. K. and Garg, A.** (2010). Congenital generalized lipodystrophy, type 4 (CGL4) associated with myopathy due to novel PTRF mutations. *Am. J. Med. Genet. A* 152A, 2245-2253.
- Shatz, M. and Liscovitch, M.** (2008). Caveolin-1: a tumor-promoting role in human cancer. *Int. J. Radiat. Biol.* 84, 177-189.
- Shaul, P. W., Smart, E. J., Robinson, L. J., German, Z., Yuhanna, I. S., Ying, Y., Anderson, R. G. and Michel, T.** (1996). Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J. Biol. Chem.* 271, 6518-6522.
- Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzameli, I., Yin, H. and Flier, J. S.** (2006). TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J. Clin. Invest* 116, 3015-3025.
- Shulman, G. I.** (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest* 106, 171-176.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569-572.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M. and Czaja, M. J.** (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135.
- Sinha, B., Koster, D., Ruez, R., Gonnord, P., Bastiani, M., Abankwa, D., Stan, R. V., Butler-Browne, G., Védie, B., Johannes, L. et al.** (2011). Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell* 144, 402-413.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A. and Anderson, R. G.** (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell Biol.* 127, 1185-1197.
- Song, K. S., Scherer, P. E., Tang, Z., Okamoto, T., Li, S., Chafel, M., Chu, C., Kohtz, D. S. and Lisanti, M. P.** (1996). Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271, 15160-15165.
- Sonveaux, P., Martinive, P., DeWever, J., Batova, Z., Daneau, G., Pelat, M., Ghisdal, P., Gregoire, V., Dessy, C., Balligand, J. L. et al.** (2004). Caveolin-1 expression is

critical for vascular endothelial growth factor-induced ischemic hindlimb collateralization and nitric oxide-mediated angiogenesis. *Circ. Res.* 95, 154-161.

Sotgia, F., Lee, J. K., Das, K., Bedford, M., Petrucci, T. C., Macioce, P., Sargiacomo, M., Bricarelli, F. D., Minetti, C., Sudol, M. et al. (2000). Caveolin-3 directly interacts with the C-terminal tail of beta -dystroglycan. Identification of a central WW-like domain within caveolin family members. *J. Biol. Chem.* 275, 38048-38058.

Sotgia, F., Schubert, W., Pestell, R. G. and Lisanti, M. P. (2006). Genetic ablation of caveolin-1 in mammary epithelial cells increases milk production and hyper-activates STAT5a signaling. *Cancer Biol. Ther.* 5, 292-297.

Souto, R. P., Vallega, G., Wharton, J., Vinten, J., Tranum-Jensen, J. and Pilch, P. F. (2003). Immunopurification and characterization of rat adipocyte caveolae suggest their dissociation from insulin signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 18321-18329.

Spalding, K. L., Arner, E., Westermarck, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Naslund, E., Britton, T. et al. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 453, 783-787.

Stahlhut, M. and Van Deurs, B. (2000). Identification of filamin as a novel ligand for caveolin-1: evidence for the organization of caveolin-1-associated membrane domains by the actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* 11, 325-337.

Stralfors, P. and Belfrage, P. (1983). Phosphorylation of hormone-sensitive lipase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 258, 15146-15152.

Subramanian, V., Rothenberg, A., Gomez, C., Cohen, A. W., Garcia, A., Bhattacharyya, S., Shapiro, L., Dolios, G., Wang, R., Lisanti, M. P. et al. (2004). Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* 279, 42062-42071.

Suzuoki, M., Miyamoto, M., Kato, K., Hiraoka, K., Oshikiri, T., Nakakubo, Y., Fukunaga, A., Shichinohe, T., Shinohara, T., Itoh, T. et al. (2002). Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 87, 1140-1144.

Sztalryd, C., Xu, G., Dorward, H., Tansey, J. T., Contreras, J. A., Kimmel, A. R. and Londos, C. (2003). Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J. Cell Biol.* 161, 1093-1103.

Tagawa, A., Mezzacasa, A., Hayer, A., Longatti, A., Pelkmans, L. and Helenius, A. (2005). Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters
1. *J. Cell Biol* 170, 769-779.

Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J., Roush, D. L., Zee, J. V., Gavrilova, O., Reitman, M. L., Deng, C. X., Li, C., Kimmel, A. R. et al. (2001). Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 6494-6499.

- Taschler, U., Radner, F. P., Heier, C., Schreiber, R., Schweiger, M., Schoiswohl, G., Preiss-Landl, K., Jaeger, D., Reiter, B., Koefeler, H. C. et al.** (2011). Monoglyceride lipase deficiency in mice impairs lipolysis and attenuates diet-induced insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 17467-17477.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R. and Fujimoto, T.** (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J. Biol. Chem.* 277, 44507-44512.
- Tchoukalova, Y. D., Votruba, S. B., Tchkonina, T., Giorgadze, N., Kirkland, J. L. and Jensen, M. D.** (2010). Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 18226-18231.
- Tenta, R., Katopodis, H., Chatziioannou, A., Pilalis, E., Calvo, E., Luu-The, V., Labrie, F., Kolisis, F. and Koutsilieris, M.** (2007). Microarray analysis of survival pathways in human PC-3 prostate cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics.* 4, 309-318.
- Tiruppathi, C., Song, W., Bergenfeldt, M., Sass, P. and Malik, A. B.** (1997). Gp60 activation mediates albumin transcytosis in endothelial cells by tyrosine kinase-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272, 25968-25975.
- Tong, S. Y., Ki, K. D., Lee, J. M., Kang, M. J., Ha, T. K., Chung, S. I., Chi, S. G. and Lee, S. K.** (2010). Frequent inactivation of hSRBC in ovarian cancers by promoter CpG island hypermethylation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 89, 629-635.
- Tornqvist, H. and Belfrage, P.** (1976). Purification and some properties of a monoacylglycerol-hydrolyzing enzyme of rat adipose tissue. *J. Biol. Chem.* 251, 813-819.
- Trajkovski, M., Hausser, J., Soutschek, J., Bhat, B., Akin, A., Zavolan, M., Heim, M. H. and Stoffel, M.** (2011). MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 474, 649-653.
- Trigatti, B. L., Anderson, R. G. and Gerber, G. E.** (1999). Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 34-39.
- Unger, R. H., Clark, G. O., Scherer, P. E. and Orci, L.** (2010). Lipid homeostasis, lipotoxicity and the metabolic syndrome
4. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 209-214.
- Villena, J. A., Roy, S., Sarkadi-Nagy, E., Kim, K. H. and Sul, H. S.** (2004). Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 279, 47066-47075.
- Vinten, J., Johnsen, A. H., Roepstorff, P., Harpoth, J. and Trandum-Jensen, J.** (2005). Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* 1717, 34-40.
- Vinten, J., Voldstedlund, M., Clausen, H., Christiansen, K., Carlsen, J. and Trandum-Jensen, J.** (2001). A 60-kDa protein abundant in adipocyte caveolae. *Cell Tissue Res.* 305, 99-106.

- Virtue, S. and Vidal-Puig, A.** (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 338-349.
- Voldstedlund, M., Vinten, J. and Trandum-Jensen, J.** (2001). cav-p60 expression in rat muscle tissues. Distribution of caveolar proteins. *Cell Tissue Res.* 306, 265-276.
- Volonte, D., Zhang, K., Lisanti, M. P. and Galbiati, F.** (2002). Expression of caveolin-1 induces premature cellular senescence in primary cultures of murine fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* 13, 2502-2517.
- Waltermann, M., Hinz, A., Robenek, H., Troyer, D., Reichelt, R., Malkus, U., Galla, H. J., Kalscheuer, R., Stoveken, T., von, L. P. et al.** (2005). Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Mol. Microbiol.* 55, 750-763.
- Wanaski, S. P., Ng, B. K. and Glaser, M.** (2003). Caveolin scaffolding region and the membrane binding region of SRC form lateral membrane domains. *Biochemistry* 42, 42-56.
- Wang, H., Sreenivasan, U., Hu, H., Saladino, A., Polster, B. M., Lund, L. M., Gong, D. W., Stanley, W. C. and Sztalryd, C.** (2011a). Perilipin 5, lipid droplet associated protein provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J. Lipid Res.*
- Wang, M. C., Min, W., Freudiger, C. W., Ruvkun, G. and Xie, X. S.** (2011b). RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. *Nat. Methods* 8, 135-138.
- Weisberg, S. P., Hunter, D., Huber, R., Lemieux, J., Slaymaker, S., Vaddi, K., Charo, I., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W., Jr.** (2006). CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J. Clin. Invest* 116, 115-124.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L. and Ferrante, A. W., Jr.** (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest* 112, 1796-1808.
- Wernstedt, A., I, Mundy, D. I., Weng, J., Anderson, R. G. and Scherer, P. E.** (2012). Altered mitochondrial function and metabolic inflexibility associated with loss of caveolin-1. *Cell Metab* 15, 171-185.
- Winer, D. A., Winer, S., Shen, L., Wadia, P. P., Yantha, J., Paltser, G., Tsui, H., Wu, P., Davidson, M. G., Alonso, M. N. et al.** (2011). B cells promote insulin resistance through modulation of T cells and production of pathogenic IgG antibodies. *Nat. Med.* 17, 610-617.
- Winer, S., Chan, Y., Paltser, G., Truong, D., Tsui, H., Bahrami, J., Dorfman, R., Wang, Y., Zielenski, J., Mastronardi, F. et al.** (2009). Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat. Med.* 15, 921-929.
- Wolins, N. E., Quaynor, B. K., Skinner, J. R., Schoenfish, M. J., Tzekov, A. and Bickel, P. E.** (2005). S3-12, Adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes. *J. Biol. Chem.* 280, 19146-19155.

- Woodman, S. E., Cheung, M. W., Tarr, M., North, A. C., Schubert, W., Lagaud, G., Marks, C. B., Russell, R. G., Hassan, G. S., Factor, S. M. et al. (2004). Urogenital alterations in aged male caveolin-1 knockout mice. *J. Urol.* 171, 950-957.
- World Health Organization. (2011). Non communicable diseases and mental health. In *Global status report on noncommunicable diseases 2010*.
- Wu, H., Ghosh, S., Perrard, X. D., Feng, L., Garcia, G. E., Perrard, J. L., Sweeney, J. F., Peterson, L. E., Chan, L., Smith, C. W. et al. (2007). T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation* 115, 1029-1038.
- Wunderlich, C., Schmeisser, A., Heerwagen, C., Ebner, B., Schober, K., Braun-Dullaeus, R. C., Schwencke, C., Kasper, M., Morawietz, H. and Strasser, R. H. (2008a). Chronic NOS inhibition prevents adverse lung remodeling and pulmonary arterial hypertension in caveolin-1 knockout mice. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 21, 507-515.
- Wunderlich, C., Schober, K., Kasper, M., Heerwagen, C., Marquetant, R., Ebner, B., Forkmann, M., Schoen, S., Braun-Dullaeus, R. C., Schmeisser, A. et al. (2008b). Nitric oxide synthases are crucially involved in the development of the severe cardiomyopathy of caveolin-1 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377, 769-774.
- Xu, H., Barnes, G. T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C. J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J. S., Tartaglia, L. A. et al. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest* 112, 1821-1830.
- Xu, X. L., Wu, L. C., Du, F., Davis, A., Peyton, M., Tomizawa, Y., Maitra, A., Tomlinson, G., Gazdar, A. F., Weissman, B. E. et al. (2001). Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers. *Cancer Res.* 61, 7943-7949.
- Yamaguchi, T., Omatsu, N., Matsushita, S. and Osumi, T. (2004). CGI-58 interacts with perilipin and is localized to lipid droplets. Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome. *J. Biol. Chem.* 279, 30490-30497.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Jensen, R. A. and Ishikawa, Y. (1999). Caveolin is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptor signaling. *Exp. Cell Res.* 247, 380-388.
- Yamamoto, M., Toya, Y., Schwencke, C., Lisanti, M. P., Myers, M. G., Jr. and Ishikawa, Y. (1998). Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 26962-26968.
- Yeaman, S. J., Smith, G. M., Jepson, C. A., Wood, S. L. and Emmison, N. (1994). The multifunctional role of hormone-sensitive lipase in lipid metabolism. *Adv. Enzyme Regul.* 34, 355-370.
- Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I. F., Bauer, M. P., Lin, M. I., Drab, M., Kurzchalia, T. V., Stan, R. V. and Sessa, W. C. (2006a). Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J. Clin. Invest* 116, 1284-1291.

- Yu, J., Bergaya, S., Murata, T., Alp, I. F., Bauer, M. P., Lin, M. I., Drab, M., Kurzchalia, T. V., Stan, R. V. and Sessa, W. C.** (2006b). Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J. Clin. Invest* 116, 1284-1291.
- Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A. and Madeo, F.** (2012). FAT SIGN1. *Cell Metab* 15, 279-291.
- Zehmer, J. K., Huang, Y., Peng, G., Pu, J., Anderson, R. G. and Liu, P.** (2009). A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic. *Proteomics*. 9, 914-921.
- Zhao, Y. Y., Zhao, Y. D., Mirza, M. K., Huang, J. H., Potula, H. H., Vogel, S. M., Brovkovich, V., Yuan, J. X., Wharton, J. and Malik, A. B.** (2009). Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *J. Clin. Invest* 119, 2009-2018.
- Zheng, Y. Z., Boscher, C., Inder, K. R., Fairbank, M. R., Loo, D. R., Hill, M. M., Nabi, I. R. and Foster, L. J.** (2011). Differential impact of caveolae and caveolin-1 scaffolds on the membrane raft proteome. *Mol. Cell Proteomics*.
- Zimmermann, R., Strauss, J. G., Haemmerle, G., Schoiswohl, G., Birner-Gruenberger, R., Riederer, M., Lass, A., Neuberger, G., Eisenhaber, F., Hermetter, A. et al.** (2004). Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306, 1383-1386.
- Zochbauer-Muller, S., Fong, K. M., Geradts, J., Xu, X., Seidl, S., End-Pfutzenreuter, A., Lang, G., Heller, G., Zielinski, C. C., Gazdar, A. F. et al.** (2005). Expression of the candidate tumor suppressor gene hSRBC is frequently lost in primary lung cancers with and without DNA methylation. *Oncogene* 24, 6249-6255.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K. and Daum, G.** (2000). Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1469, 101-120.

ANNEXE I

« The lipoatrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes »

Soazig Le Lay, Nolwenn Briand, Cedric M. Blouin, Daniele Chateau, Cecilia Prado, Françoise Lasnier, Xaver Lelievre, Eric Hajduch, Isabelle Dugail.

Autophagy 2010 Aug;6(6):754-63

The lipoatrophic caveolin-1 deficient mouse model reveals autophagy in mature adipocytes

Soazig Le Lay,^{1,3} Nolwenn Briand,^{1,3} Cédric M. Blouin,^{1,3} Danielle Chateau,^{1,3} Cecilia Prado,¹ Françoise Lasnier,^{1,3} Xavier Le Liepvre,^{1,3} Eric Hajdúch^{1,3} and Isabelle Dugail^{1,3,*}

¹Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, U872; Paris, France; ²Université Pierre et Marie Curie, Paris6, UMR S 872; Paris, France; ³Université Paris Descartes; Paris, France

Key words: adipocyte, lipolysis, caveolin, insulin, lipid droplet, autophagy

Adipose tissue lipoatrophy caused by caveolin gene deletion in mice is not linked to defective adipocyte differentiation. We show that adipose tissue development cannot be rescued by endothelial specific caveolin-1 re-expression, indicating primordial role of caveolin in mature adipocytes. Partial or total caveolin deficiency in adipocytes induced broad protein expression defects, including but not limited to previously described downregulation of insulin receptor. Global alterations in protein turnover, and accelerated degradation of long-lived proteins were found in caveolin-deficient adipocytes. Lipidation of endogenous LC3 autophagy marker and distribution of GFP-LC3 into aggregates demonstrated activated autophagy in the absence of caveolin-1 in adipocytes. Furthermore, electron microscopy revealed autophagic vacuoles in caveolin-1 deficient but not control adipocytes. Surprisingly, significant levels of lipidated LC3-II were found around lipid droplets of normal adipocytes, maintained in nutrient-rich conditions or isolated from fed mice, which do not display autophagy. Altogether, these data indicate that caveolin deficiency induce autophagy in adipocytes, a feature that is not a physiological response to fasting in normal fat cells. This likely resulted from defective insulin and lipolytic responses that converge in chronic nutrient shortage in adipocytes lacking caveolin-1. This is the first report of a pathological situation with autophagy as an adaptative response to adipocyte failure.

Introduction

Variation in adipose tissue mass is physiologically driven by changes in energy balance, as an adaptation to nutrient flux. This can be achieved through multiple and interdependent mechanisms such as the control of adipocyte differentiation to ultimately determine the total number of fat cells. Another important control point is the regulation of fat cell metabolism through fine tuning of lipid storage and mobilization by adipocyte specific and nutrition-dependent signaling pathways. Finally, the process of adipocyte cell death may also participate in adipose tissue remodeling, as a recent study on the dynamics of fat cell turnover established that approximately 10% of fat cells are renewed every year in humans.¹

The study of metabolic phenotypes generated in animal models by specific gene deletion has proven to be an invaluable tool to unravel the molecular mechanisms of energy homeostasis and storage. In this line, a recently described mouse model with hepatocyte-specific knockout of the autophagy gene *Atg7* has identified autophagy, a process related to the breakdown of cellular components to meet energy demand in times of nutrient scarcity, as a novel pathway regulating lipid metabolism.² In the liver of these mice, inhibition of autophagy increased intracellular lipid deposition by impairing triacylglycerol stores breakdown, leading to the concept of “lipoautophagy” in which intracellular lipid

droplets could be degraded through delivery to lysosomes by autophagy.

More recently, two studies reported that adipose tissue specific knockout of *Atg7* surprisingly generated lean mice,^{3,4} indicating that loss of autophagy in fat or liver had opposite effects on lipid accumulation. This apparent discrepancy is solved by the observation that *Atg7* deletion primarily impaired white adipocyte differentiation, and generated mice with fat cells displaying brown adipocyte features with elevated energy expenditure.³ Although this study reveals that autophagy is required for the process of adipocyte conversion, it remains to be established whether modulation of autophagy in mature fat cells, that did not affect white adipocyte differentiation, would have net effects on lipid deposition in adipose tissue. The physiological relevance of this question relies on impaired autophagy frequently seen in humans with aging,⁵ a process that commonly coincides with growing adiposity. On the other hand, it can also be envisioned that some lipoatrophic phenotypes, as those seen in rare congenital lipodystrophy or those acquired upon treatment by pharmacological compounds such as anti HIV drugs, could be linked to autophagic process within adipocytes.

Adipocyte differentiation was proven to be an efficient pathway to target to produce lipoatrophy in genetically engineered mouse models^{6,7} and some mutations in differentiation-related genes have been found in lipodystrophic patients.⁸ However, not

*Correspondence to: Isabelle Dugail; Email: isabelle.dugail@crc.jussieu.fr

Submitted: 01/11/10; Revised: 05/31/10; Accepted: 06/03/10

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/12574

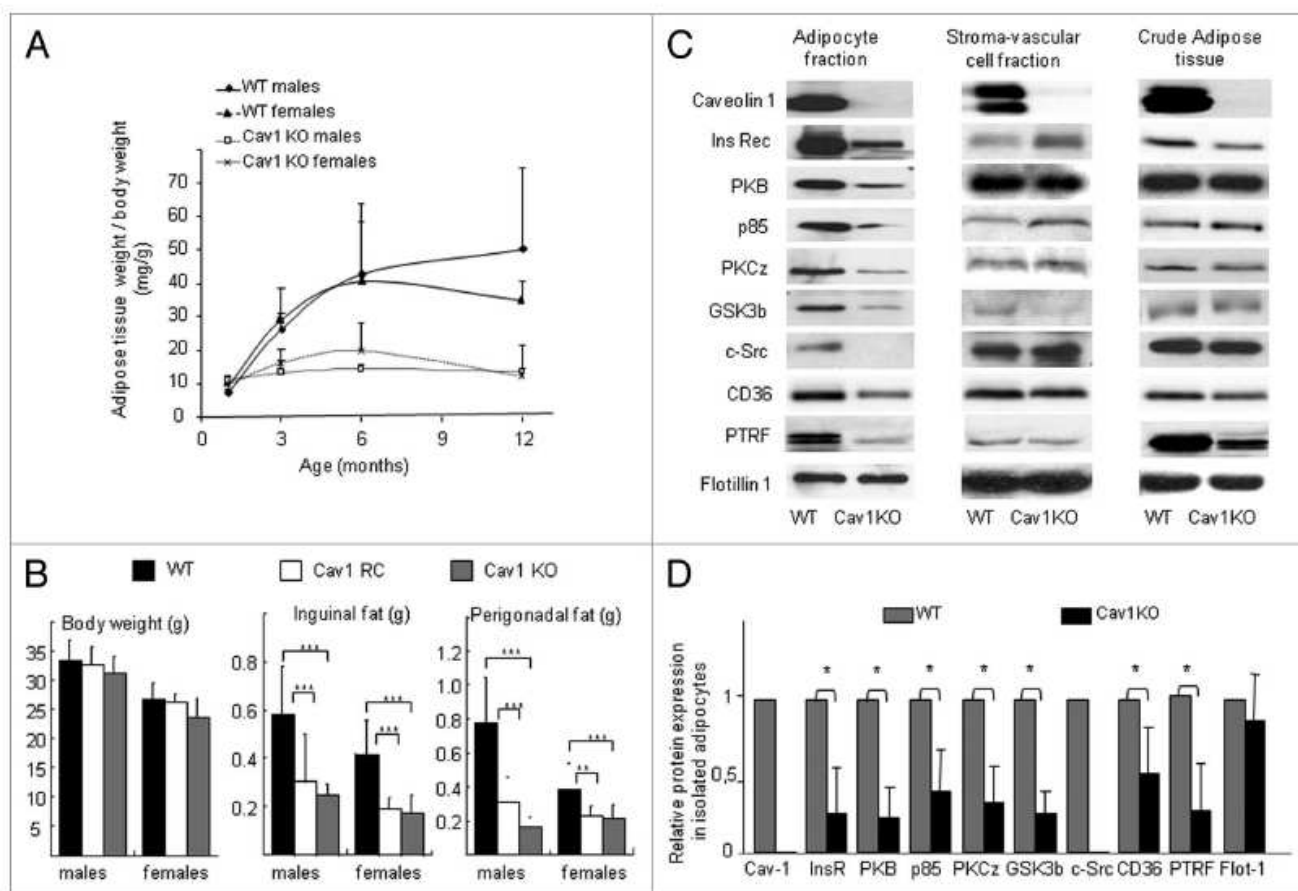


Figure 1. Lipotrophy in caveolin-1 null mice is not rescued by caveolin reexpression in endothelial cells, and results from widespread protein expression defects in adipocyte but not stroma-vascular cell fraction. (A) Adiposity index evaluated as the sum of subcutaneous inguinal and perigonadic depots relative to body weight from birth to 12 months of age. Values are means \pm sem obtained from at least 8 individual mice in each group. (B) Body weight, inguinal and perigonadal fat pad weights at 6 months of age in wild type (WT), caveolin-1 null (Cav1-KO) and caveolin-1 null with caveolin rescue in the endothelium (Cav1-RC). (C) Western blot analysis of protein expression in isolated adipocytes (left part), stroma-vascular cell fraction (middle) and crude adipose tissue (right) in WT and Cav1-KO mice. Equal protein amounts from WT and Cav1-KO mice were loaded (crude adipose tissue samples 20 μ g, isolated adipocytes 10 μ g, Stroma-vascular cell fraction 50 μ g). (D) Quantitative analysis of western blots by densitometric scanning. Four independent cell preparations obtained from pooled adipose tissue of three mice per group were used.

all lipodystrophy genes in humans have connections with adipocyte differentiation. As an example, the abolition of caveolin-1 expression that causes lipodystrophy in mice⁹ and humans¹⁰ has no effect on adipose conversion. In the present study we report that a mouse model with progressive lipodystrophy, caused by caveolin-1 gene deletion disclose autophagic features in mature adipocytes, is likely to contribute to adipose tissue failure.

Results

Progressive lipodystrophy in caveolin-1 null mice is due to caveolin deficiency in adipocyte but not in endothelial cell. Caveolin-1 null mice were described as a lean mouse strain that develop progressive lipodystrophy aggravating with age.⁹ In the present study, we used an independently established colony¹¹ in which lipodystrophy is also present, although developing with a slightly different time frame. Adipose tissue is normally produced until 4 weeks of age (Fig. 1A and B) in control or mutant mice, confirming that

caveolin-1 is not required for adipocyte differentiation in vivo. At older ages, however, defects in fat pad development became significant from 3 months onwards both in male and female caveolin-1 null mice (Fig. 1A and B). Because caveolin-1 plays a critical role in endothelial transport of circulating molecules across blood vessels, it is possible that caveolin deficiency might cause lipodystrophy through impaired nutrients delivery to adipocytes. To test this, we used the recently described caveolin-1 null mouse with endothelial-specific rescue of caveolin-1 expression, cav-1 RC.¹² In this model, it was demonstrated that most vascular, cardiac and pulmonary defects displayed by the mice with global caveolin deficiency could be normalized, underlying the importance of caveolin endothelial expression.¹² Nevertheless, caveolin-1 RC mice exhibited a lean phenotype, similar to age-matched caveolin-1 null mice with total invalidation (Fig. 1B). Thus, rescue of caveolin expression in endothelium was ineffective to normalize adipose tissue development, indicating that lean phenotype does not result from caveolin-1 deficiency in vascular endothelium but

in adipocytes. Adipocyte morphology was normal (including a central unilocular lipid droplet with peripherally positioned nucleus) in Cav1-KO and Cav1-RC mice compared to WT, but revealed drastic reduction in size, indicating extensive reductions of lipid stores in caveolin-deficient adipocytes.

Caveolin-1 null adipocytes display broad defects in protein expression. A previous study by Lisanti's group reported decreased insulin receptor expression in caveolin-1 null mice adipose tissue.¹³ Because the insulin receptor directly interacts with caveolin-1, it was suggested that caveolin-1 deficiency abrogated insulin response, a defect that might be instrumental in lipotrophy. Focusing on isolated adipocytes lacking caveolin-1, we found that the expression of a substantial number of proteins with various subcellular distributions and functions was decreased in addition to the insulin receptor (Fig. 1C). Indeed, quantitative analyses of western blots revealed an overall decline in the steady state protein levels ranging from two- to four-fold for the insulin receptor beta subunit, protein kinase B/Akt, CD36, the p85 regulatory subunit of PI3 kinase, PTRF/cavin, the atypical protein kinase C zeta (PKC ζ) and glycogen synthase kinase 3 β and to nearly undetectable levels for the tyrosine kinase c-src (Fig. 1D). Some other proteins remained, however, expressed at normal levels, such as flotillin-1 or Glut4, indicating widespread but not generalized protein changes. It is noteworthy that these defects in protein expression were observed specifically in adipocytes but not in the stroma-vascular fraction that contains other cell types present in adipose tissue, thereby contributing to mask the differences observed in isolated adipocytes when analyzing crude adipose tissue lysates (Fig. 1C). Thus, our data reveal widespread defects in protein expression in caveolin-1 null mice, broader than the previously recognized insulin receptor defect, that specifically affect the mature adipocyte cell fraction. We also found that steady state levels of mRNA corresponding to affected proteins were normal in caveolin-1 null adipocytes, indicating specific alterations at the protein level (Suppl. Fig. 1). Some of the proteins affected by caveolin-1 deficiency such as CD36 and PTRF were previously described as caveolae-associated. Others, however, such as GSK3 β , p85, PKC ζ or PKB/Akt are unrelated to these structures, making unlikely a potential chaperone role of caveolin through direct interaction.

Caveolin-1 silencing in culture reproduces adipocyte protein expression defects and alters long-lived protein turnover. We used retrovirally infected 3T3-L1 cells to generate fat cells expressing a caveolin-1 shRNA sequence (Cav1-KD) in which caveolin-1 expression was downregulated. The lipid filled morphology of Cav1-KD adipocytes was indistinguishable from that of control RVH1 (empty vector) cells or parental 3T3-L1 adipocytes (Fig. 2A), confirming that caveolin-1 is not required for the adipose conversion process. Unaffected adipose conversion in Cav1-KD is of crucial importance in these studies because in vivo, protein expression defects in the absence of caveolin-1 were observed only in mature adipocytes and not in other non-lipid filled cell types (Fig. 1C). In fully mature differentiated Cav1-KD cells, caveolin-1 protein expression was decreased by 60% (Fig. 2B). In these cells, we found that PTRF, PKB/Akt, GSK3 β and p85 expressions were decreased to half of their levels

in differentiated RVH1 controls (Fig. 2B). Thus, Cav1-KD adipocytes reproduced protein alterations observed in primary fat cells lacking caveolin-1.

To delineate whether protein synthesis or degradation was affected, we examined the kinetics of protein decline in the presence of a protein synthesis inhibitor, cycloheximide. We found that PKB/Akt declined more rapidly in Cav1-KD than in control RVH1 adipocytes, with an apparent protein half-life reduced from 5.5 h in RVH1 control to 3.5 h in Cav1-KD, pointing to protein degradation as the targeted step (Fig. 2C). In order to examine the contribution of ubiquitin-dependent proteasome in protein turnover, we used proteasome inhibitors. Unlike ADRP (Adipocyte Differentiation Related Protein), a well-known adipocyte protein regulated through proteasome-dependent protein degradation,¹⁴ steady state levels of PTRF, PKB/Akt, GSK3 β and p85 were not altered by the presence of proteasome inhibitors (MG123 or ALLN) over a 6-hour incubation period, suggesting a proteasome-independent process (Suppl. Fig. 2).

We next established another cell system to study total caveolin deficiency in adipocytes, in which fat cells were derived from Cav1 KO mouse embryonic fibroblasts (MEFs) differentiated in culture (Fig. 2D). In this system, metabolic labeling with a tritiated amino acid glycine led to comparable label incorporation into TCA insoluble material in WT and Cav1-KO MEFs-derived adipocytes (Fig. 2E), suggesting unaffected protein synthesis. After a 24-hour chase with unlabeled glycine, the rate of long-lived protein degradation was measured by counting TCA soluble radioactivity release into the culture medium within an additional 24-hour period. Within this time frame, Cav1-KO MEFs degraded a significantly higher portion of labeled proteins than controls (Fig. 2F). The contribution of proteasome-dependent degradation to total protein degradation was evaluated by using the MG132 proteasome inhibitor and indicates increased protein degradation in Cav1-KO MEFs, independent of the proteasome action (Fig. 2G). All together, these data indicate that partial or total deficiency in caveolin-1 expression alters adipocyte protein turnover towards an accelerated proteasome-independent degradation.

Autophagosome formation is activated in adipocytes lacking caveolin-1. A wide range of cell components and especially long-lived proteins are degraded in the lysosomal pathway through a nonspecific catabolic process known as macroautophagy. Because caveolin-deficient adipocytes exhibit widespread defects in protein expression linked to accelerated protein degradation, we examined autophagic activity in caveolin-1 deficient adipocytes. During autophagy, portions of the cell cytoplasm or organelles are engulfed by a membrane to form autophagosomes, and later digested into lysosomes. A critical step in this process is the ligation of the soluble microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3-I, also known as Atg8) to phosphatidylethanolamine, generating type II-membrane-associated LC3 (LC3-II). As LC3 membrane association is widely accepted as a marker for autophagosome formation,¹⁵ we first compared LC3 status in adipocytes with partial or total caveolin deficiency. In Cav1-KD adipocytes, as well as in Cav1-KO, endogenous LC3-II/LC3-I ratios were significantly increased compared to respective controls (Fig. 3A).

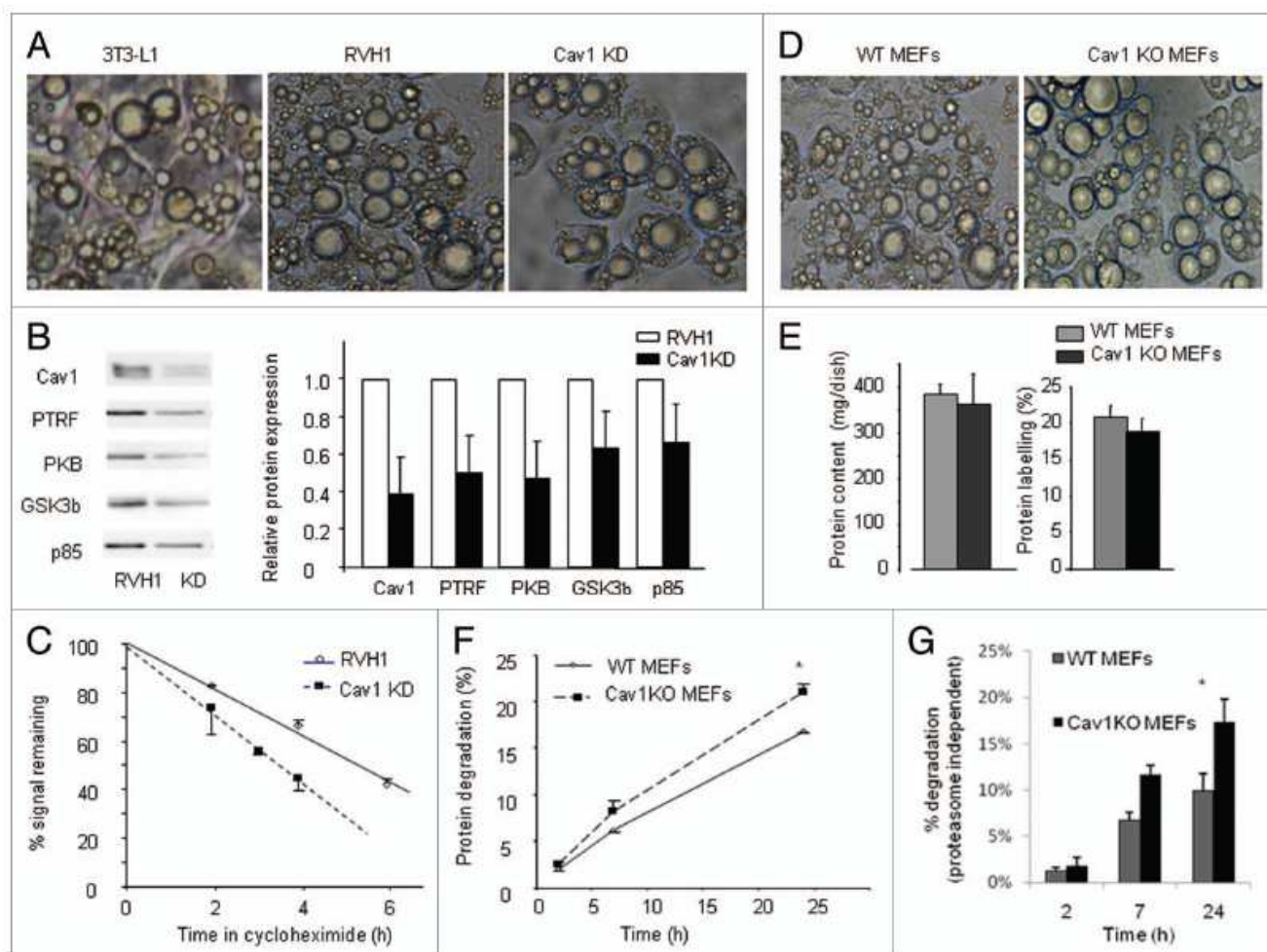


Figure 2. Accelerated protein degradation in adipocytes with partial or total caveolin deficiency. (A and D) Phase contrast images of terminally differentiated adipocytes of the parental 3T3-L1 or cells stably expressing a caveolin-1 shRNA sequence (Cav1-KD) or an empty vector (RVH1). Differentiated MEFs derived from WT or Cav1-KO mice are shown. In D Note that highly refractive lipid droplets are equally present in all conditions. (B) Protein expression in controls and Cav1-KD adipocytes (7 days post induction of differentiation). (C) PKB protein degradation in Cav1-KD differentiated adipocytes. RVH1 controls and Cav1-KD adipocytes were treated with cycloheximide (time 0). PKB contents were assessed over time, values are expressed as a fraction of initial PKB contents, $n = 3$. (E-G) Long-lived protein degradation in WT and Cav1-KO MEFs derived adipocytes. At the end of labeling period with tritiated glycine, total protein contents and label incorporation into TCA insoluble material are measured (E). After an additional 24 h chase, TCA soluble label released into the culture medium was counted over time (F) to assessed long-lived protein degradation. In (G), the proteasome inhibitor MG132 (50 μ M) was added or not at time 0, and proteasome-independent degradation was calculated as the difference in radioactive release in the absence or presence of MG132. Values are means of triplicates in a typical experiment out of three.

To further establish that autophagic flux is increased in Cav1-KO MEFs derived adipocytes, we compared the levels of the selective autophagic substrate p62. p62 significantly decreased in Cav1-KD and Cav1-KO compared to their respective controls, suggesting ongoing autophagic flux (Fig. 3A). Furthermore, LC3-II accumulated in MEFs derived Cav1-KO in the presence of lysosomal protein inhibitors E64 and Pepstatin (Fig. 3B). We observed only a moderate accumulation of endogenous LC3-II upon proteinase inhibitors treatment. Since lipidated LC3-II can localize to lipid droplets as the result of a still undefined autophagy-independent process (see below Figs. 3C and 6), this may contribute to attenuate LC3-II accumulation upon lysosomal blockade. LC3 membrane association was also assessed in situ

after adenoviral transduction of adipocytes with a GFP-LC3 fusion construct. Under standard culture conditions, WT adipocytes displayed diffuse homogenous intracellular distribution of GFP-LC3, whereas in cells lacking caveolin-1, it mainly distributed as aggregates indicative of autophagosome formation (Fig. 3C). Furthermore, GFP-LC3 distribution in aggregates was prevented by wortmannin and 3-methyladenine, both general inhibitors of PI3 kinases that are known to be required to initiate autophagy (Fig. 3C). These data indicate constitutive autophagosome formation in caveolin-1 deficient adipocytes that we further confirmed in morphological studies by transmission electron microscopy. In caveolin-1 deficient MEFs-derived adipocytes but not in controls, intracytoplasmic structures reminiscent of

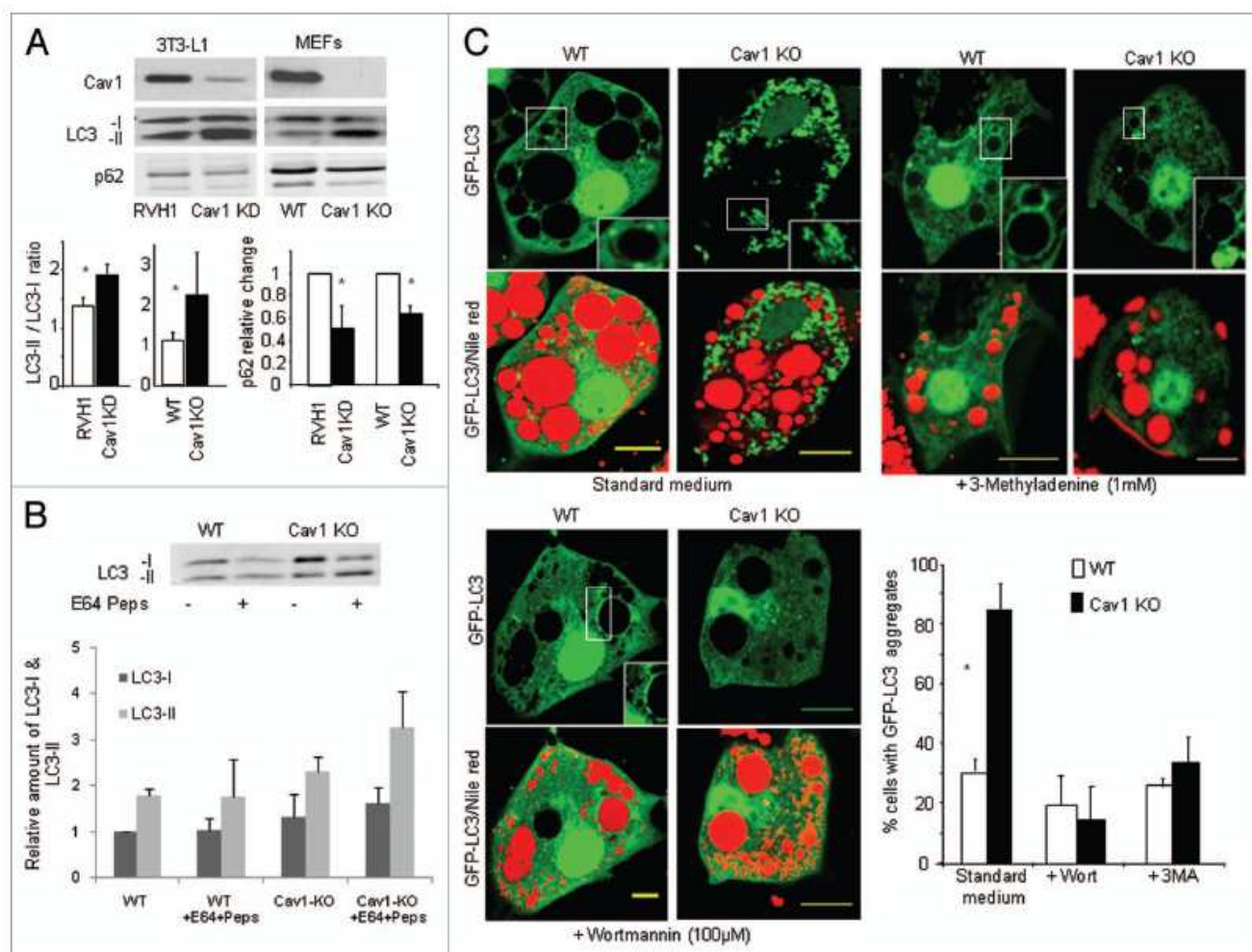


Figure 3. Endogenous and GFP-LC3 expression in caveolin-deficient adipocytes. (A) Endogenous LC3 and p62 expression in Cav1-KD or Cav1-KO differentiated adipocytes versus corresponding controls. (B) Effect of lysosomal protease inhibitors (E64 and pepstatin 10 μ g/ml each for 1 h) on endogenous LC3 in MEFs. Representative western blots are shown. Bars are means \pm sem from five independent determinations. (C) MEFs transfected with GFP-LC3 were treated with effectors in the presence of E64 and pepstatin. Nile red visualise lipid droplets, scale bar is 10 μ m. Quantification of the percentage of cells with LC3 aggregates is shown (n = 3).

autophagosomes were observed (Fig. 4A). Altogether, these data demonstrate constitutive activation of autophagy in cultured caveolin-deficient adipocytes.

Constitutive autophagy is present *in vivo* in caveolin-1 null mice adipose tissue. The adipose tissue of caveolin-1 null mice was next examined for presence of autophagosomes *in vivo*. Similarly to that observed in cultured cells, electron microscopy revealed multiple structures evoking autophagosomes in the cytoplasm of caveolin-null mice adipocytes (Fig. 4B). Moreover, endogenous LC3-II/LC3-I ratios were significantly increased in caveolin-deficient compared to control adipose tissue extracts, whereas no difference could be seen in the liver (Fig. 5A). Finally, both the expression and phosphorylation state of the mammalian target of rapamycin (mTOR), a crucial regulator of autophagy were examined. When dephosphorylated, mTOR potently induces autophagy.¹⁶ Dramatic decrease (80%) in mTOR and its phosphorylation at the Ser 2448 site were observed in caveolin-1

null mice adipocytes compared to controls (Fig. 5B), fitting with a constitutively high autophagic activity in caveolin-deficient adipocytes.

LC3-II can localize to adipocyte lipid droplets independently of autophagy. Surprisingly, ring-like structures of GFP-LC3 could be seen around some lipid droplets in cells treated with autophagy inhibitors, otherwise displaying diffuse GFP-LC3 distribution (see inserts in wortmannin-treated WT adipocytes or Cav1-KO adipocytes with 3-Methyladenine in Fig. 3C). Furthermore, untreated 3T3-L1 adipocytes cultured under standard conditions that showed diffuse GFP-LC3 in the cytoplasm, sometimes displayed intense punctate GFP-LC3 labeling forming a cup around some lipid droplets, a feature that coexisted with regular ring-like structures decorating the lipid droplet surface (Fig. 6A). These observations fit with a recently published study in which LC3 was reported to localize to the surface of lipid droplets formed during starvation in cardiomyocytes

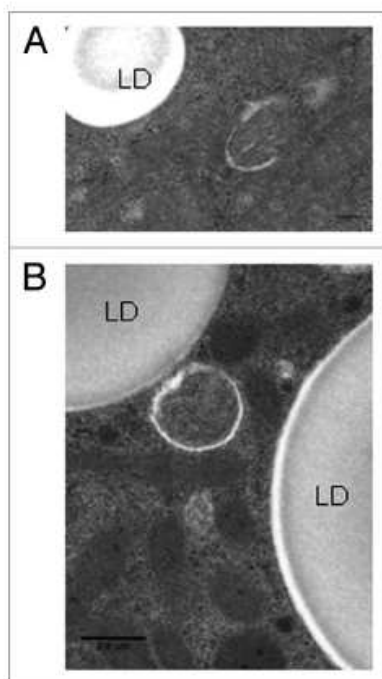


Figure 4. Autophagosomes are present in Cav1-KO MEFs derived adipocytes and in adipose tissue of caveolin-1 null mice. Electron microscopy images of cultured adipocytes derived from Cav1-KO MEFs (A) or adipose tissue of caveolin-1 null mice (B). LD designate lipid droplets.

or hepatocytes.¹⁷ However, LC3 association to adipocyte lipid droplets was observed in the present study under conditions of inhibited autophagy or even standard conditions. This suggested that LC3 might associate to lipid droplets independently of ongoing autophagy. To further examine LC3 distribution between lipid droplets and autophagosomes, cell lysates from WT and Cav-1 deficient adipocytes in which autophagy is constitutively activated were fractionated by density gradient centrifugation, that efficiently separated lipid droplets from the bulk of total membranes.¹⁸ As expected, lipidated LC3-II was recovered in the highest density fraction 7 (containing intracellular vesicles and total membranes) exclusively in autophagic Cav1-null adipocytes but not in WT controls (Fig. 6B). In contrast, in WT as well as in Cav-1 null samples, LC3-II was similarly detected in the lower density fraction that contains lipid droplets (see the distribution of perilipin, an exclusive lipid droplet marker in this fraction and ref. 9). Caveolin-1, which also dually distributes in adipocyte total membranes and lipid droplets¹⁹ could be recovered in the highest and lowest density fractions of the density gradient (Fig. 6B). Equivalent results were obtained in 3T3-L1 adipocytes treated with rapamycin to induce autophagy (Fig. 6C). We observed that whereas LC3-II/LC3-I ratio did increase in the total membrane fraction of rapamycin-treated 3T3-L1 adipocytes, no change in the proportion of lipidated LC3 could be seen in the lipid droplet fraction. These data indicate that LC3-II distribution around lipid droplets is not obligatorily linked to autophagy, but might reflect a distinct yet uncharacterized function linked to lipid storage.

Discussion

Despite strong conservation of the cellular autophagic machinery among species from yeast to humans and multiple situations in development, physiological adaptation or disease that involve autophagy in various cell types, this process has never been given much attention in the context of adipose tissue. Recent data, however, indicate that autophagy is a required process for the differentiation of white preadipocytes and influences the balance between white and brown fat.^{3,20} In agreement, earlier ultrastructural studies by electron microscopy in 3T3-L1 differentiating adipocytes had noticed the presence of “large populations of autophagic vacuoles” that may reflect a temporally activated process linked to dramatic remodeling the cytoplasm required by lipid droplet formation.²¹

Viewed as a cellular process involved in the clearance of damaged cellular products or organelles, autophagy is potentially important in every cell type including adipocytes. However, as a cellular response intended to meet energy demand in periods of scarcity, autophagy might not be essential in the fully mature adipocyte that is designed to handle energy surplus. Why would adipocytes, which store the largest energy reservoir in the body, suffer energy demand and induce autophagy? Rather, adipocyte physiological response to fasting involves mobilization of lipid stores and subsequent release of lipolytic products to provide other tissues with energy substrates. During this process, adipocyte is likely to meet its own cellular energy needs from fatty acid oxidation, by directly using lipolytic products. In agreement, the ratio of fatty acid to glycerol release during lipolysis is often lower than 3/1,²² suggesting consumption of part of the fatty acids. In addition, adipocyte AMPK which is a potent stimulator of fatty acid oxidation is activated by lipolytic hormones²³ suggesting internal energy production from lipolytic products. Thus, autophagy is not likely a physiological response to fasting in adipocytes.

In the present study, we describe constitutively activated adipocyte autophagy in a mouse model with lipoatrophic adipose tissue and caveolin-1 deficiency. This is based on three independent lines of evidence indicating (i) altered protein turnover and accelerated protein degradation in caveolin-deficient adipocytes, (ii) autophagosome formation monitored by endogenous and exogenous autophagy marker LC3 and (iii) presence of autophagic vacuoles in caveolin-deficient adipocytes by electron microscopy imaging. Caveolin-1 is well known as a scaffolding protein that covers the cytoplasmic face of membrane invaginated caveolae. It is an abundant protein in adipocytes, in which approximately 30% of plasma membrane surface is estimated to be covered with caveolae.²⁴ Among multiple roles, caveolae can promote the transduction of the insulin signal²⁵ and subsequent nutrient uptake,²⁴ a function that might be of particular relevance in the context of adipocytes. The effect of caveolin-1 deficiency in mice, as well as in humans, is defective adipose tissue lipid storage and lipoatrophy.^{9,10} Our data suggest that this phenotype could be linked to an activated autophagy, promoted specifically in adipocytes by caveolin deficiency (Fig. 7). Why would fat cells lacking caveolin-1 be faced with energy demand to induce autophagy? Firstly, caveolin-1 deficient adipocytes are unable to mobilize

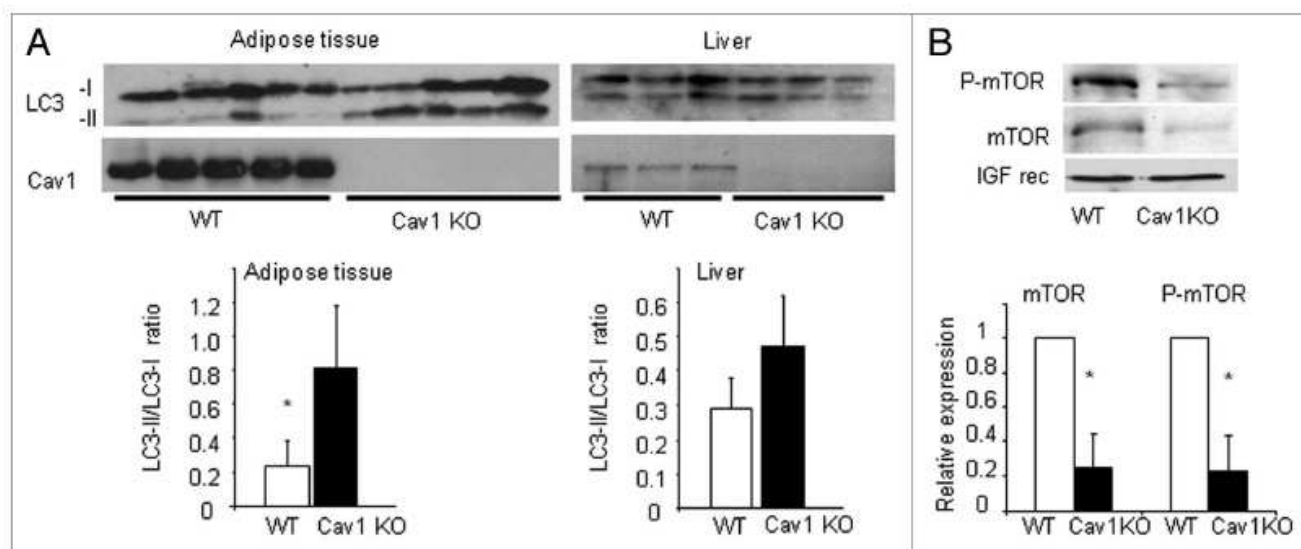


Figure 5. Autophagy in adipose tissue of caveolin-1 null mice in vivo. (A) Western blot analysis of LC3 in adipose tissue and liver of WT or Cav1-KO mice. Each lane represents one individual animal, bars are mean \pm sem of LC3II/LC3I ratios. (B) mTOR contents and phosphorylation at Serine 2448 in isolated adipocytes of WT or Cav1-KO mice. IGF receptor contents were shown as loading controls and used for normalization.

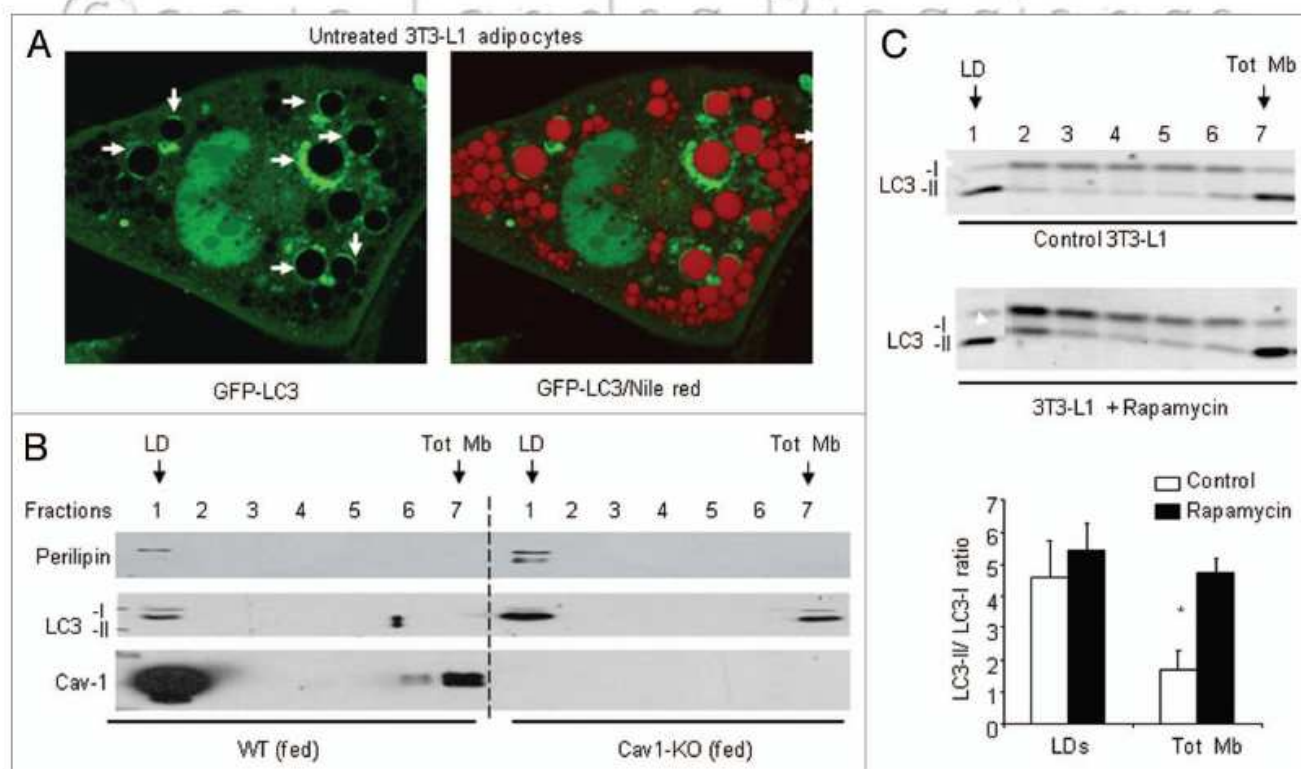


Figure 6. LC3 association with adipocyte lipid droplets. (A) Untreated 3T3-L1 adipocytes expressing GFP-LC3 maintained in standard medium. Note the presence of GFP-LC3 around lipid droplets (white arrows). (B) LC3 distribution after fractionation of adipocyte lysates on sucrose gradient. Seven fractions numbered from top (LDs) to bottom (Tot Mb), were blotted for indicated proteins, a representative experiment out of three is shown. (C) Effect of rapamycin (100 nM) on LC3 distribution after fractionation on a sucrose gradient as in (B). Bars are means for LC3-I/LC3-II ratios in lipid droplets and total membranes fractions.

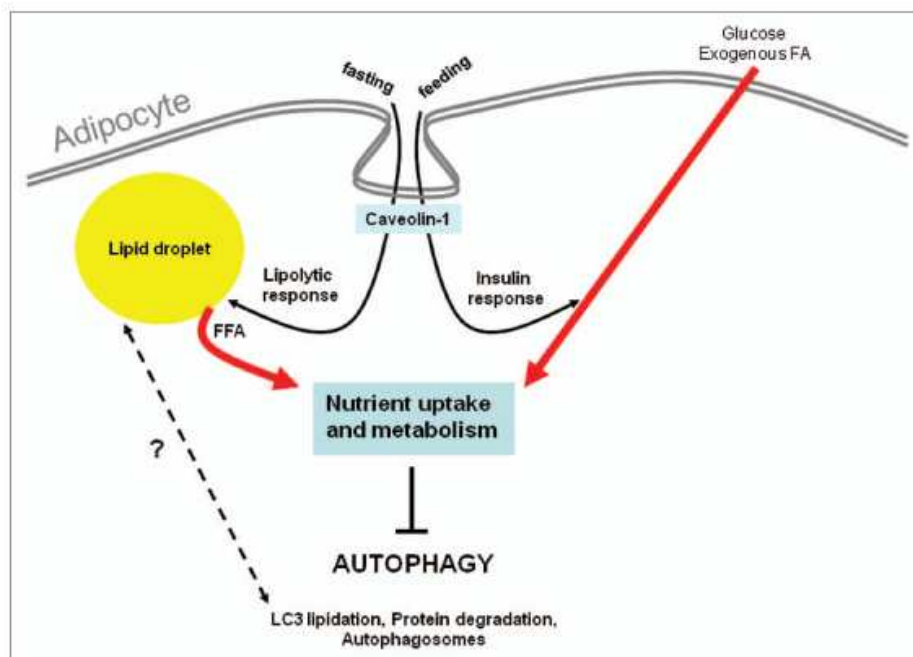


Figure 7. Schematic representation of the role of caveolin-1 in adipocyte leading to autophagy. Caveolin 1 expression is responsible for the formation of caveolae invaginations at the adipocyte plasma membrane. These structures positively control insulin response to stimulate nutrient (glucose and fatty acids) uptake and metabolism after feeding. During fasting, caveolin-1 is also required for stimulated lipolytic response and fatty acid release from the adipocyte lipid droplet. Thereby, caveolin-1 actions converge to inhibit autophagy. The dotted line indicates that lipidated LC3 also associates to adipocyte lipid droplets in an autophagy-independent manner.

large amounts of fatty acids in response to beta-adrenergic agonists, and stimulated lipolysis is largely blunted in adipocytes lacking caveolin (reviewed in ref. 26 and our unpublished data). Defective lipolysis might thus shorten adipocyte energy supply from mobilized fatty acids during fasting. Secondly, caveolin-deficient adipocytes are insulin-resistant.¹³ Thus, since the entry of nutrients into fat cells is largely insulin-dependent, insulin resistance might impair energy supply to caveolin-devoid fat cells by reducing nutrient delivery, even in post-prandial periods. Accordingly, caveolin-deficient adipocytes are faced with a particular situation in which defective fatty acid mobilization coexisting with altered insulin-dependent nutrient supply converge to induce autophagy.

To our knowledge, this is the first report showing that autophagy might be related to adipose tissue failure and lipodystrophy. This raises the question of whether autophagy might represent a general process in lipodystrophic pathologies. Obviously, recently reported lipodystrophies caused by mutations in the cavin gene family²⁷ are first-choice candidates, since loss of cavin expression leads to secondary caveolae disruption.²⁸ Among other lipodystrophic syndromes that have no established links to adipocyte differentiation, Berardinelli Seip Congenital Lipodystrophy (BSCL) caused by seipin gene mutations²⁹ might also be linked to adipose autophagy. Alterations in lipid droplet structure have been reported in seipin-deficient yeasts³⁰ that might be associated to lipolytic defects. However, evidence indicating that seipin gene mutations could alter insulin dependent nutrient delivery to fat cells are still lacking. Nevertheless, by pointing out a novel link

between autophagy and lipoatrophic adipose tissue development, our study raises the possibility that autophagy might constitute a general process in adipose tissue failure and lipodystrophy, which could lead to novel approaches in these diseases.

An intriguing point raised by the present study relies on lipid droplet association of the autophagy marker LC3. Lipidation of LC3 results from the activation of a ubiquitination-like cascade involving multiple Atg proteins, ultimately leading to LC3 conjugation to phosphatidylethanolamine.³¹ Because LC3-II remains present on autophagosomes during their entire maturation process, it is therefore considered as a marker for autophagy in various situations. Thus, the presence of LC3-II on lipid droplets would suggest that they can be true substrates for targeted lysosome degradation. Accordingly, LC3-II was found in lipid droplets preparations from heart and liver tissues of starved animals.¹⁷ In the present study, we report that LC3-II can be found on adipocyte lipid droplets independent of autophagy activation. Indeed, by fluorescent imaging, LC3 was found distributed not only in the cytoplasm of differentiated 3T3-L1 adipocytes maintained in standard culture conditions, but also around some, but not all, lipid droplets. It could also be recovered as a LC3-II lipid conjugated form in purified lipid droplet fractions prepared from normally-fed mice adipocytes. This suggests that lipid droplet-associated LC3-II in adipocytes is not associated with autophagy, and raises questions about the relationship between LC3 and the lipid storage organelle. A previous example of an LC3-dependent, autophagy-independent process was described during phagocytosis in macrophages, in

which LC3 lipidation on phagosomes was not associated with the formation of classical membrane structures characteristic of autophagosomes.³² Since LC3 is present on lipid droplets in its PE-conjugated form, then we cannot exclude that its presence results from the fusion of early autophagosomes to lipid droplets. This would suggest a link between formation of autophagosomal membranes and lipid droplets. In addition, the role played by LC3-II of on lipid droplets, if any, remains to be clarified. Recent studies indicated that LC3 could act in membrane hemi-fusion,¹⁵ a process that might be important for lipid droplets that are enclosed by a phospholipid monolayer. In this regard, relying to their unique property to contain prominent lipid droplets, adipocyte might constitute a valuable cell model for the detailed study of the modalities of LC3/lipid droplet association and its biological significance.

Materials and Methods

Materials. Antibodies were as follows: caveolin-1 (BD Biosciences, 610407) PTRF (BD Biosciences, 611258) Flotillin-1 (BD Biosciences, 610821); insulin receptor beta subunit (Santa Cruz Biotechnology, sc-711) and PI3K p85 subunit from (Upstate, OS-217), PKC ζ (Santa Cruz Biotechnology, sc216), c-Src (Santa Cruz Biotechnology, sc-18) and IGF Receptor beta subunit (Santa Cruz Biotechnology, sc-713), native PKB (Cell signaling, 9272), GSK3 β (Cell signaling, 9315), mTOR (Cell signaling, 2972), Ser 2448-Phospho-mTOR (Cell signalling, 2971). CD36, LC3 and p62 antibodies were generously provided by Wolfgang Stremmel (University of Heidelberg) Patrice Codogno (INSERM, Chateaufort Malabry) and Anne-Françoise Burnol (Institut Cochin, Paris). GFP-LC3 adenovirus was kindly provided by Sharon Tooze (London Research Institute, UK) and was amplified in QBI-HEK 293A cells and purified on a cesium chloride gradient.

Animals. Animal studies were conducted according to the French guidelines for the care and use of experimental animals. Caveolin-1 null mice were provided by T. Kurzchalia (MPI, Dresden) and caveolin-1 RC mice were obtained from WC Sessa (Yale University School of Medicine, New Haven).

Isolation of primary adipocytes and stroma-vascular fraction. Adipocytes were isolated by collagenase digestion of fat pads.³³ Floating adipocytes and stroma-vascular cell fractions were collected separately as described previously.³³

Cell culture. 3T3-L1 cells (from Dr J. Pairault, Paris) were maintained and differentiated as described previously.³⁴ Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) were prepared from 13.5 p.c. embryos and cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum. Adipocyte differentiation was induced as described for 3T3-L1 cells except that rosiglitazone (0.5 μ M) was added. Stable 3T3-L1 knockdown for cav-1 (Cav1 KD) was obtained

by infecting 3T3-L1 with pRVH1-puro containing the following shRNA targeting sequence (AA)GAT GTG ATT GCA GAA CCA G as previously described.³⁵

Western blotting. Samples were lysed in 50 mM Tris, pH 7.4, 0.27 M sucrose, 1 mM Na-orthovanadate, pH 10, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM Na- β -glycerophosphate, 50 mM NaF, 5 mM Na-pyrophosphate, 1% (w/v) Triton X-100, 0.1% (v/v) 2 β -mercaptoethanol and protease inhibitors, centrifuged (15,000 g, 4°C for 10 min) and stored at -80°C. Protein concentrations were determined by Biorad protein assay kit (Bio-Rad, 500-0006). Samples were subjected to SDS/PAGE and blotted according to standard procedures. Protein signals were visualized using Super signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34080).

Long-lived protein degradation. Cells maintained in 6-well-plates were labeled with 5 μ Ci [2H³] Glycine (30 Ci/mole) for 16 h. After washing they were incubated with medium containing 10 mM unlabeled aminoacid for subsequent 24 h. Aliquots from medium and cells were then collected at the indicated times, adjusted to 0.3% BSA (final concentration) and treated with 20% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C. Radioactivity was measured in supernatants and pellets by scintillation counting. Relative protein degradation was expressed as a percentage of TCA soluble radioactivity recovered in the medium relative to total TCA insoluble radioactive counts in solubilized cells at time zero.

Immunofluorescence. Cells on coverslips were infected by GFP-LC3 adenoviruses coverslips, fixed with 3% paraformaldehyde, stained in PBS/Nile Red solution (1/5,000^e from 1 mM stock solution in EtOH) and mounted in Mowiol (Calbiochem, 475904) for visualization by confocal laser fluorescence (Zeiss LSM 510).

Electron microscopy. Samples were prepared essentially as described²¹ and imaged on a Jeol 100CII transmission electron microscope equipped with a digital camera.

Statistical analysis. Statistical analysis was carried out using a Student's t test or variance analysis. Data were considered statistically significant at p values <0.05 and notified by *.

Acknowledgements

We thank Patrice Codogno for help during initial stages of the work and critical reading of the manuscript. C Klein from the CICC imaging facility is thanked. Funding from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013 under Grant Agreement No. 202272 is acknowledged.

Note

Supplementary materials can be found at: www.landesbioscience.com/supplement/LeLayAUTO6-6-Sup.pdf

References

- Spalding KL, Amer E, Westermarck PO, Bernard S, Buchholz BA, Bergmann O, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature* 2008; 453:783-7.
- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 2009; 458:1131-5.
- Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* 2009; 119:3329-39.
- Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S. Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106:19860-5.
- Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Droge W, Ffrench M, Terman A. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy* 2005; 1:131-40.
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, et al. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev* 1998; 12:3168-81.

7. Shimomura I, Hammer RE, Richardson JA, Ikemoto S, Bashmakov Y, Goldstein JL, et al. Insulin resistance and diabetes mellitus in transgenic mice expressing nuclear SREBP-1c in adipose tissue: model for congenital generalized lipodystrophy. *Genes Dev* 1998; 12:3182-94.
8. Capeau J, Magre J, Lascols O, Caron M, Berezat V, Vigouroux C, et al. Diseases of adipose tissue: genetic and acquired lipodystrophies. *Biochem Soc Trans* 2005; 33:1073-7.
9. Razani B, Combs TP, Wang XB, Frank PG, Park DS, Russell RG, et al. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J Biol Chem* 2002; 277:8635-47.
10. Kim CA, Delepine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, et al. Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:1129-34.
11. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 2001; 293:2449-52.
12. Murata T, Lin MI, Huang Y, Yu J, Bauer PM, Giordano FJ, et al. Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J Exp Med* 2007; 204:2373-82.
13. Cohen AW, Razani B, Wang XB, Combs TP, Williams TM, Scherer PE, et al. Caveolin-1-deficient mice show insulin resistance and defective insulin receptor protein expression in adipose tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 285:222-35.
14. Xu G, Sztalryd C, Lu X, Tansey JT, Gan J, Dorward H, et al. Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem* 2005; 280:42841-7.
15. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell* 2007; 130:165-78.
16. Meijer AJ, Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med* 2010; 27:411-25.
17. Shibata M, Yoshimura K, Furuya N, Koike M, Ueno T, Komatsu M, et al. The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 382:419-23.
18. Le Lay S, Hajdouch E, Lindsay MR, Le Liepvre X, Thiele C, Ferré P, et al. Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic* 2006; 7:549-61.
19. Blouin CM, Le Lay S, Eberl A, Koefeler HC, Guerrero IC, Klein C, et al. Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: Alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J Lipid Res* 2010; 51:945-56.
20. Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* 2009; 5:1-13.
21. Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM, Rubin CS. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol* 1980; 87:180-96.
22. Vaughan M. The Production and Release of Glycerol by Adipose Tissue Incubated in Vitro. *J Biol Chem* 1962; 237:3354-8.
23. Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, et al. Anti-lipolytic Action of AMP-activated Protein Kinase in Rodent Adipocytes. *J Biol Chem* 2005; 280:25250-7.
24. Irtegen U, Aboulaich N, Ist A, Strlsfors P. A new role for caveolae as metabolic platforms. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18:344-9.
25. Yamamoto M, Taya Y, Schwencke C, Lisanti MP, Myers MJ, Ishikawa Y. Caveolin is an activator of insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 1998; 273:26962-8.
26. Cohen AW, Razani B, Schubert W, Williams TM, Wang XB, Iyengar P, et al. Role of Caveolin-1 in the Modulation of Lipolysis and Lipid Droplet Formation. *Diabetes* 2004; 53:1261-70.
27. Hayashi YK, Matsuda C, Ogawa M, Goto K, Tominaga K, Mitsuhashi S, et al. Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J Clin Invest* 2009; 119:2623-33.
28. Liu L, Brown D, McKee M, Lebrasseur NK, Yang D, Albrecht KH, et al. Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia and glucose intolerance. *Cell Metab* 2008; 8:310-7.
29. Magre J, Delepine M, Khalouf E, Gedde-Dahl T Jr, Van ML, Sobel E, et al. Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nat Genet* 2001; 28:365-70.
30. Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, et al. Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol* 2008; 180:473-82.
31. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 2000; 19:5720-8.
32. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SW, Moshich S, Dorsey F, Connell S, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 2007; 450:1253-7.
33. Rodbell M. Metabolism of isolated fat cells. I: effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 1964; 239:375-80.
34. Kim S, Dugail I, Standridge M, Claycombe K, Chun J, Moustaid-Moussa N. Angiotensin II-responsive element is the insulin-responsive element in the adipocyte fatty acid synthase gene: role of adipocyte determination and differentiation factor 1/sterol-regulatory-element-binding protein 1c. *Biochem J* 2001; 357:899-904.
35. Schuck S, Manninen A, Honsho M, Fullekrug J, Simons K. Generation of single and double knock-downs in polarized epithelial cells by retrovirus-mediated RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:4912-7.

ANNEXE II

« Cavin proteins : New players in the caveolae field »

Nolwenn Briand, Isabelle Dugail, Soazig Le Lay.

Biochimie. 2011 Jan;93 (1):71-7



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

Journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi



Mini-review

Cavin proteins: New players in the caveolae field

Nolwenn Briand^{a,b,c}, Isabelle Dugail^{a,b,c}, Soazig Le Lay^{a,b,c,*}

^a Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, U872, 15 rue de l'école de médecine, Paris F-75006, France

^b Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, UMR S 872, Paris F-75006, France

^c Université Paris Descartes, UMR S 872, Paris F-75006, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 January 2010

Accepted 29 March 2010

Available online 2 April 2010

Keywords:

Caveolin

Cavin

Caveolae

PTRF

SDPR

ABSTRACT

Caveolae are specialized lipid microdomains, forming small invaginations in the plasma membrane, known to be implicated in multiple functions including lipid storage, cell signaling and endocytosis. Formation of these wide flask-shaped invaginations is dependent on the expression of a caveolar coat-protein, namely caveolin. Until now, the accepted paradigm was that caveolin was the sole and only structural protein of caveolae since its expression was necessary and sufficient to drive caveolae biogenesis. The recent characterizations of PTRF/cavin-1 and subsequently other cavin family members in caveolae formation have highlighted additional levels of complexity in the biogenesis of these plasma membrane invaginations. In this review, recent advances on the role of the different cavin family members in the regulation of caveolae structures as well as potential new functions will be discussed.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Caveolae are specialized lipid microdomains that were first described by electron microscopists in the early 1950s [1,2] as (little caves) corresponding to invaginations of the plasma membrane with a diameter in the range of 50–100 nm [3]. Caveolae structures are particularly enriched in cholesterol, glycosphingolipids and lipid-anchored proteins relative to the bulk of plasma membrane and considered as a subclass of lipid-rafts microdomains, reviewed in [4]. Due their specific lipid composition, they concentrate a number of signaling molecules modulating multiple cellular processes or trafficking events from the cell surface.

Although largely described from a morphological point of view, the structural components of these plasma membrane invaginations remained unknown until two independent groups cloned simultaneously caveolin-1/VIP21 and identified this 21 kDa protein as the first true protein marker of caveolae structures [5,6]. Until now, the accepted paradigm was that caveolin was the sole and only structural protein of caveolae since its expression was necessary and sufficient to drive caveolae biogenesis in lymphocytes [7]. Despite intense research on caveolin and caveolae functions, the presence of such membrane invaginations particularly abundant in endothelial cells and in adipocytes still remained enigmatic [8,9].

Recent publications have highlighted the role of the family related-proteins cavin in caveolae formation therefore providing

additional data on molecular aspects of caveolae formation and potentially new functions [10,11].

In this respect, the present paper aims at reviewing new aspects of cavin in the regulation of caveolae structures and their potential interest in elucidating the functions of these original invaginations.

1. Cavin proteins: new regulators of caveolae biogenesis

Although some proteins like PTRF (Polymerase I and transcript release factor) originally identified as an RNA Pol I transcription factor (also called Cav-P60 and now termed cavin-1) were previously shown to be enriched in caveolae, it's only recently that its crucial role in caveolae formation has been unraveled [12,13]. Following this exciting discovery, three other proteins, named cavin-2 (or SDPR for serum deprivation protein response) [14], cavin-3 (or SRBC for sdr-related gene product that binds to-c-kinase) [15] and cavin-4 (or MURC for muscle restricted coiled-coiled protein or cavin-4) [16], all sharing homology with cavin-1, were shown to be critical regulators for caveolae dynamics. All these cavin have been given several different names (alternate names of cavin family members are reviewed in [17]), but cavin nomenclature will be further used in this review.

1.1. The cavin family protein

Based on sequence homology with cavin-1, three other proteins renamed cavin-2 to 4 have been described as being part of the cavin family. They have all been shown to be present or isolated in

* Corresponding author at: Centre de Recherche des Cordeliers, INSERM, U872 Equipe 8, 15 rue de l'école de médecine, Paris F-75006, France. Tel.: +33 142346901; fax: +33 140518586.

E-mail address: soazig.lelay@crc.jussieu.fr (S. Le Lay).

caveolae preparations and to share similar features in terms of molecular organization [12–16]. Indeed, they all contain putative leucine zipper-like domains normally involved in protein–protein interactions and PEST domains (proline, glutamic acid, serine and threonine-rich domains), which may play a role in targeting proteins towards proteolytic degradation [18]. Cavin-1 can indeed be found under different proteolytic forms still associated with caveolae. However, cavin-1 is the only member containing polybasic signals, possibly nuclear localization signals, in line with its initial described function as a transcription factor [19]. Other common features between cavins are their ability to bind to phosphatidylserine and to be phosphorylated on multiple sites [18]. In addition, studies have linked cavin-2 and cavin-3 to protein kinase-C delta [20] or alpha [21]. These different properties of cavin proteins raise the possibility that they would be able to regulate some aspects of caveolae functions.

1.2. Cavin-1: a new scaffold for caveolae

Cavin-1 was originally identified by two independent groups using yeast two-hybrid systems [19,22] as a soluble nuclear factor that regulates transcription process. Recombinant cavin-1 protein is able to dissociate ternary Pol I transcription complexes *in vitro* as revealed by the release of both Pol I and nascent transcripts from the template [19] and facilitates the reinitiation of RNA polymerase I [23]. It's only recently that this factor was also abundantly found in caveolae membranes derived from adipocytes by immunological and morphological procedures [18,24] leading to consider it as a caveolae marker.

A critical role for cavin-1 at the plasma membrane has emerged from recent publications reporting that this protein was required for caveolae formation [12,13]. Accordingly, cavin-1 expression was strictly parallel to that of caveolin-1 in mice tissues with its highest expression found in fat and lung, predicting a functional link between both proteins [13,22]. Cavin-1 is recruited by caveolins to plasma membrane caveolar domains and is necessary for caveolae formation [12,13]. Indeed, absence of cavin-1 leads to the loss of morphologically identifiable caveolae and to diminished protein expression of all three caveolin isoforms whereas no alterations at the level of mRNA of caveolins were observed. Cavin-1 downregulation is also accompanied by an increase of caveolin-1 mobility, which is released from the cell surface and rapidly internalized and degraded [13].

Caveolin and cavin-1 were found to be in close proximity by FRET experiments when situated at the plasma membrane [13] but a direct interaction between these two proteins is still controversial (see Section 2). Experimental results tend to prove that cavin-1 will contribute to the last steps of caveolae biogenesis. Indeed, it only associates with plasma membrane caveolae but not with non-caveolar caveolins (like caveolins at the Golgi level) [13,25]. Therefore, cavin-1 has to be considered as a soluble protein, which would be recruited to caveolae operating like a new scaffold stabilizing the caveolae unit.

It has been estimated that cavin-1 and caveolin were present in an approximate ratio 1:1 within caveolae [13] and that lipid-binding was likely to play a role in cavin association with these invaginations. In agreement, cavin-1 and caveolin-1 associate in a cholesterol-dependent manner and can both bind to phosphatidylserine [12,13], consistent with the fact that caveolae are particularly enriched in these lipid species [26]. However, further investigations will be needed to understand lipid–protein interaction that may be required for the structural stability of the nascent caveolae structures.

1.3. Cavin-2: generating caveolae curvature?

The breach opened by studies of cavin-1 in caveolae formation leads to question about the respective roles of other protein members

of the cavin family. Cavin-2 is sharing more than 20% similarities with cavin-1 [14,18]. This 2nd member of the cavin family was found to be enriched in caveolae preparations and to co-localize with caveolin [21] filling the requirements for being a modulator of caveolae formation as cavin-1. Indeed, cavin-2 downregulation induces loss of cavin-1 and caveolin expression and therefore limits caveolae formation meaning that cavin-1, cavin-2 and caveolin-1 are functionally inter-dependent [14]. Co-immunoprecipitations experiments showed that cavin-2 and cavin-1 do indeed bind to each other, but that this interaction does not require caveolin-1 and that cavin-2 promotes recruitment of cavin-1 to caveolae [14]. An interesting observation is that, unlike caveolin-1 or cavin-1 respectively, cavin-2 alone does not increase caveolae number but induces changes in caveolae morphology, which turns to appear distended and induces caveolae-associated tubule formation [14]. These membrane tubulations closely resembling those induced by B-subunit of Shiga toxin (STB) [27] can originate from caveolae [14], even if these structures are not required for their formation [27]. Therefore, cavin-2 could be seen as the membrane-curvature component of caveolae although no sequence similarity has been found so far between cavin-2 and known curvature-inducing protein domain [28].

1.4. Cavin-3: regulator of the caveolar endocytic pathway?

Cavin-3 was originally identified in screens looking for PKCdelta-binding protein [20] but also in yeast two-hybrid screening using BRCA1 as bait [29]. The human CAVIN3 gene (maps to 11q15.5–15.4) is situated in a tumor suppressor region and is inactivated in breast and lungs cancers. Considering its homology with cavin-1, this has recently led to consider its role in caveolae structures. Alternative splicing of cavin-3 mRNA can potentially produce five isoforms with size ranking from 14.3 kDa to 31.1 kDa [15]. Although all cavin-3 isoforms were predicted to be soluble, this protein was previously identified in proteomic screens enriched in detergent-free caveolae [18,30]. This localization was recently confirmed by immunofluorescence and shown to be dependent on leucine-zipper domain and expression of caveolin-1 [15]. Interestingly, cavin-3 still associates with caveolin upon caveolae budding to form vesicles and intracellular caveolin-1 traffic is markedly impaired in the absence of cavin-3 [15]. Altogether, these results suggest that one potential role for cavin-3 might be to couple caveolae to the intracellular transport machinery.

1.5. Cavin-4: the muscle-restricted cavin

Through sequence homology searches, a fourth member of the cavin family was reported and termed cavin-4 [16]. This protein was previously described as purely cytosolic and able to interact with cavin-2 [31]. Cavin-4 was shown to be associated with cardiac dysfunction through the modulation of the Rho/ROCK pathway and to be important in muscle biogenesis [32]. This is in agreement with the specific expression of cavin-4 in cardiac and muscle tissues, which parallels caveolin-3 expression [16]. Cavin-4 was also found to associate with sarcolemmal caveolae of muscle cells and its expression is perturbed in human muscle diseases associated with caveolin-3 dysfunction. This clearly identifies cavin-4 as a new potential candidate for muscle-related caveolinopathies.

2. The cavin oligomeric complex

Since the individual characterization of each cavin member revealed many common features, this questioned about the way they may interact. Recent data revealed the existence of a multi-meric protein complex containing all cavin members, which will associate with caveolins at the plasma membrane [16]. The stepwise

assembly of caveolin and cavin complexes during caveolae biogenesis process has moreover been elegantly dissected by Helenius's group providing a hierarchy of events required for the assembly of mature caveolae at the plasma membrane [25].

Interaction between caveolins and cavins was first suggested by the fact that cavin-1 to -3 family members display the same pattern of expression as caveolin-1 whereas cavin-4 expression parallels that of caveolin-3 [16]. Additionally, all cavin members have been identified to localize to plasma membrane caveolae. Interestingly, the levels of cavin expression were drastically reduced in caveolin-1 null mice [13,16]. The other way round is also true since cavin deletion also reduces caveolin-1 protein expression [14–16,33]. This strongly suggests interdependency between caveolins and cavins for their respective expression. In agreement, overexpression of cavin-1 causes a concomitant increase in caveolin-1 protein [33]. Whereas close association of cavin-1 and caveolin was demonstrated by FLIM/FRET experiments [16], a direct interaction between caveolins and cavins proteins is still however debated since co-immunoprecipitations experiments using cavin-1 antibody either provided negative results [13] or were able to bring down the cavin complex consisting of all other cavins plus caveolin-1 and -2 from plasma membranes adipocytes [16].

All members of the cavin family interact in a multimeric complex as first demonstrated by immunoblot after native gel electrophoresis of adipocytes plasma membrane fractions [16]. This cavin complex can also be detected in the cytosol, and its formation is not dependent on caveolin-1 [16]. This suggests a model in which cavin proteins would associate in the cytosol and are recruited to caveolae. Such a scheme was confirmed by the fact that caveolin-1 and cavin-1 separated in a sucrose gradient following nonionic detergents solubilization of membrane lipids [25]. Indeed, cavins occurred as stable, relatively homogenous 60 $S_{20,w}$ complexes distinct from cav-1 containing 70 $S_{20,w}$ complexes representing caveolin scaffold of the caveolar domain at the plasma membrane. Since cavin-1 associates with cell surface caveolae, but not with caveolin-1-Golgi pool [13], Hayer et al. took advantage of the use of fluorescently tagged cavin-1 and caveolin-1 after cycloheximide washout to determine at which stage of caveola maturation the two proteins will associate to each other [25]. Opposite to caveolin-1, cavin-1 was never detected in the Golgi compartment although it displays a diffuse cytosolic distribution. Dual color live-cell imaging revealed a relatively slow recruitment (at least 25 min) of cavin-1 to newly arrived plasma membrane caveolar domains with no rapid turnover of associated-cavin-1. It has been estimated that one cavin complex could be formed of 60–80 cavins whereas the 70 $S_{20,w}$ complex could be composed of 160 caveolin molecules [25], consistent with the previous estimation of 144 ± 39 caveolin-1 per caveola [34]. However, it's likely that each individual caveola would contain multiple 60 $S_{20,w}$ complexes [25].

It has been speculated that cavins may bind to specific lipid environment generated by caveolin [13]. If such a case, phosphatidylserines (PS) may appear as good candidates establishing the link between caveolins and cavins, both described as PS-binding proteins [13,26,35]. Moreover, lipid interactions, usually of weak affinity, would allow rapid dissociation of the complex offering a signaling mechanism from the cell surface to intracellular components [16,25].

How exactly this complex would assemble has not yet been established although a hierarchy of protein interactions likely exists. The different temporal expression during 3T3-L1 adipocyte differentiation where caveolin-1 and cavin-1 show identical expression patterns appearing at late stages of differentiation and preceding cavin-2 expression would let us think that the latter is recruited to caveolae after their formation at the cell surface [16]. However, some data obtained in MEFs deficient in caveolin-1 showed that, in this case, cavin-2 recruits cavin-1 to plasma membrane caveolae [14].

An interesting observation is that cavin-3 displays a high expression during all the adipocyte differentiation process, but also displays a broad expression in different tissues [16]. Taking into account the different patterns of expression observed for cavin proteins, the composition of the cavin complex might vary depending on the tissue. Whether the cavin oligomeric complex is composed of all cavins in different tissues, or could have a specific composition has to be determined. Overexpression of individual cavin members alters caveolae biogenesis, morphology or dynamics (Fig. 1) suggesting that the stoichiometry between cavins could determine the functionality of caveolae.

In the light of the different studies, it now appears that cavin assembly to caveolae occurs as a final step of caveolae biogenesis and entails the association of large preassembled protein complexes to each other [25]. The structure of mature caveolae will then be dependent on three major molecular layers: (I) a specific lipid bilayer composition enriched in cholesterol and sphingolipids, (II) an integral membrane scaffold formed by embedded-caveolin proteins and (III) a peripheral protein layer formed by cavin complexes. This last step will likely contribute to stabilize the caveolar domain, but may also control membrane curvature or caveolar budding as regard to cavin individual function.

3. What cavins tell us about caveolae function

Caveolae have been implicated in multiple cellular processes but many aspects of their putative functions are still very controversial. However, mice and humans deficient in their expression display numerous abnormalities that underscore their physiological importance, reviewed in [36,37]. Particularly, caveolin-1 deficiency revealed to be linked to a lipodystrophic syndrome. The discovery of cavins as functional components of caveolae led to consider their potential implications in caveolinopathies and in the different functions assigned to caveolae.

3.1. Cavins as new gene candidates for caveolinopathies

Mice strains with gene invalidation for all caveolin genes have been generated and have constituted invaluable tools to investigate the physiological roles of these proteins *in vivo*, reviewed in [36,38]. Surprisingly, all transgenic animals were viable and fertile despite a complete loss of muscle-caveolae in caveolin-3 deficient animals or non-muscle-caveolae in the absence of caveolin-1.

Specific phenotypes were described in these knockout animals reflecting the relative importance of caveolin expression in particular tissues. On the one hand, in line with its muscle-specific expression, invalidation of the caveolin-3 gene leads to skeletal muscle pathology and cardiomyopathy through multiple pathogenic mechanisms in mice [39,40]. On the other hand, caveolin-1 null mice display a metabolic phenotype characterized by a lipodystrophy associated with a hyperlipemia, in relation with the normal high expression of caveolin-1 in adipocytes [41].

These mice phenotypes are even more relevant considering the recent revelations of human pathology due to "caveolinopathies". CAV3 mutations were identified a decade ago in patients suffering from LMGD-1C (Limb-Girdle muscular dystrophy, [42]). To date, more than 30 cases with CAV3 mutations were reported causing four distinct autosomal dominant muscle diseases ranging from LGMD-1C to rippling muscle disease, idiopathic hyperCKemia and distal myopathy, reviewed in [43]. The molecular mechanisms implied in the pathogenesis of muscle degenerative process following caveolin-3 deficiency are multiple and only partially clarified. It can be due to sarcolemmal membrane alterations, caveolin-3 retention in the Golgi due to a dominant-negative effect of the mutated caveolin-3, disorganization of skeletal muscle

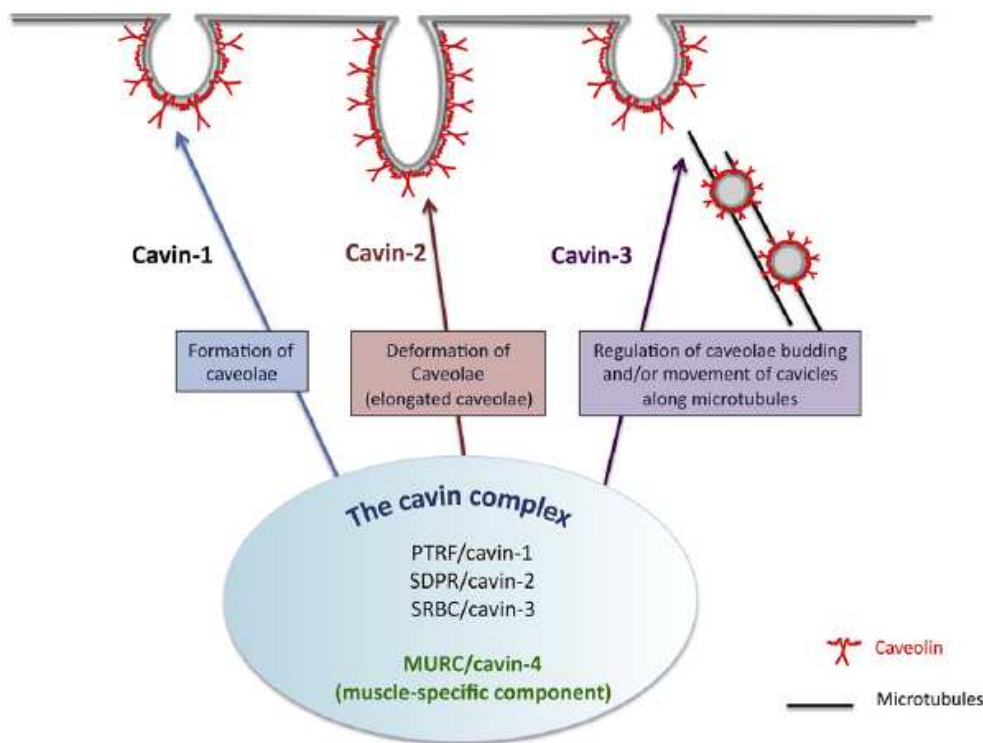


Fig. 1. Overexpression of cavin members alters biogenesis, morphology or dynamics of caveolae structures. Recent data revealed the existence a multimeric protein complex containing all cavin members, which associate with caveolins at the plasma membrane. Individual overexpression or downregulation of each cavin member has an effect on biogenesis, morphology or dynamics of the caveolae structures. Cavin-1 is recruited by caveolins to plasma membrane caveolar domains and is required for caveolae formation. Cavin-2 alone does not increase caveolae number but induces changes in caveolae morphology, which turns to appear distended. Cavin-3 still associates with caveolin upon caveolae budding to form vesicles and its absence markedly impairs intracellular caveolin-1 traffic along microtubules. Cavin-4, which has an expression restricted to cardiac and muscle tissues (parallel that of caveolin-3), constitutes the muscle-specific component of the cavin complex and associates with muscle-caveolae.

T-tubule network or disruption of distinct cell-signaling pathways. Therefore, the multiple pathogenetic mechanisms altered following CAV3 mutations underline the critical role of caveolin-3 in muscle cell physiology.

Recently, an homozygous null mutation in the CAV1 gene was identified in a patient suffering from Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy [44]. As a young adult, the patient presented a near complete absence of adipose tissue depots and also developed severe insulin-resistance associated with diabetes mellitus and was hypertriglyceridemic. Additional heterozygous mutations were subsequently observed in patients with partial lipodystrophy [45]. The identification of CAV1 as a new locus for human lipodystrophy provides human genetic evidence for a critical role of caveolin-1/caveolae in adipocyte lipid storage and insulin signaling.

However, it has been difficult so far to distinguish the respective contribution of caveolae as structural entities or of caveolins outside of caveolae in the phenotypes.

The discovery of cavins as new caveolae regulators opens new perspectives to understand the role of these invaginated structures. Particularly, the implication of the different cavins in caveolae morphology and dynamics has been proven by strategies of overexpression or downregulation of the expression of each cavin member [13–16] (see Fig. 1).

The implication of cavin-1 in caveolae formation was ascertained by the generation of mice deficient for this protein [33]. Cavin-1-KO animals are lacking caveolae in all tissues examined therefore underlying a critical role for this protein in caveolae structuration even in muscles caveolae (dependent on caveolin-3 expression). The phenotype of these transgenic mice totally parallels caveolin-1-KO mice phenotype in terms of metabolic defects [41]. Cavin-1 null

animals have a reduced adipose tissue mass, hypertriglyceridemia, glucose intolerance and hyperinsulinemia – reflecting a more pronounced metabolic phenotype than the one observed for caveolin-1 null animals. Since cavin-1 is expressed in muscles and non-muscles tissues, where caveolae are respectively driven by caveolin-3 and caveolin-1 expression, and lead to a complete loss in both types of tissues, one would expect that cavin-1 null animals would resemble the Cav-1/-3 double knockout animals [46]. However, the metabolic parameters for these latter mice have not yet been described. In line with elevated caveolin-1 expression in endothelial cells, severe defects ranging from vascular dysfunction to cardiac hypertrophy have been reported in caveolin-1 null mice, reviewed in [47]. Noteworthy, these alterations have been shown to be rescued by cell-specific re-expression of caveolin-1 in the endothelium, underlying a critical role for caveolin-1 in the physiology of endothelial cells [48]. No data related to a vascular phenotype have been published so far for cavin-1-KO mice.

Cavin-1 KO metabolic phenotype led to search for cavin mutations in ungenotyped lipodystrophies. Particularly, Hayashi and colleagues studied patients who presented with generalized lipodystrophy and muscular dystrophy despite any CAV3 mutations identified [49]. They identified missense mutations of CAVIN1 associated with deficiency and mislocalization of all three caveolin family members and reduction of caveolae structures in skeletal muscles biopsies. The metabolic complications observed in patients with CAVIN1 mutations were however milder than the one described for patients with CGL1 and CGL2 (congenital generalized lipodystrophies 1 and 2 caused by the mutations in AGPAT2 and BSCL2 respectively, see [50] for recent review) and only observed in elder patients. Caveolins deficiency, as a secondary consecutive

defect, certainly plays a role in the establishment of the lipodystrophic phenotype.

Most clinical features of cavin-1 mutated patients are then likely to be explained by secondary reduction of caveolae and/or caveolin deficiency. This suggests that all cavin members might potentially be gene candidates for caveolinopathies. Cavin-4, predominantly expressed in muscles and whose distribution is perturbed in human muscle disease associated with caveolin-3 dysfunction, raised indeed this possibility [16].

What is the link between caveolin-1 and/or cavin-1 deficiency and the lipodystrophic phenotype?

Caveolae have been shown to be a general scaffold for signal transduction, promoting physical interactions with a large variety of signaling protein partners [4]. Regarding adipose tissue, caveolins operate as positive regulators of insulin signal transduction [51], a key event for orchestration of fat storage. However, the metabolic phenotype of caveolin-1 null mice does not reflect the one of the FIRKO mice with fat-specific insulin receptor (IR) knockout [52]. The fact that caveolin loss is not equivalent to IR loss might suggest that the caveolin function in fat storage is not limited to a facilitating role in transducing the insulin signal.

Another localization of caveolins which appears highly relevant in the context of fat storage, is the lipid droplet (LD) pool, reviewed in [53]. Caveolin interaction with adipocytes LDs is a process involving caveolar endocytosis [54,55]. This suggests that LD caveolin likely originates from plasma membrane caveolae [54]. In agreement, LD associated caveolin organization closely resembles that of plasma membrane caveolin with similarly low lateral mobility (assessed by FRAP), and cavin-1 is present on lipid droplets [56]. A simplistic view would be that caveolins directly transport exogenous fatty acids or neutral lipids to lipid droplets. Rather, caveolin-1 lipid-binding capacities and structural properties suggest that it may play a role in the organization of the phospholipid layer forming lipid droplet surface. In agreement, we showed that LDs devoid of caveolin-1 (obtained from lipoatrophic adipocytes of caveolin-1 null mice) have reduced levels of phosphatidylserines (PS) compared to LDs isolated from caveolin expressing adipocytes. Moreover, those caveolin-1-deficient lipid droplets also display alterations in their protein composition, and particularly lack several PS-binding proteins such as annexin A1 and cavin-1 [56]. This suggests that LD caveolin-1/cavin-1 pool might contribute to the remodeling of the LD polar lipid surface. Moreover, caveolin-1 presence around LD favors size enlargement of these lipid storage compartments in cell culture, and caveolin concentration is specifically enriched on supersized LDs from obese rodents [56]. Therefore, caveolin-1 is an important regulatory component of the structural properties of the lipid droplet storage organelle controlling lipid droplet expandability.

How to integrate cavins in this fat picture? Considering the adipocyte morphology where caveolae are in close vicinity of the lipid storage organelle (sometimes less than 400 nm), it's easily conceivable that direct contact points between caveolae invaginations and lipid droplet surface might form, explaining the concomitant presence of caveolin-1 and cavin-1 on adipocyte LDs. Therefore, structuration of caveolae via cavin molecules might also influence caveolin LD pool and consequently fat deposition.

3.2. Cavins and the signaling function of caveolae platforms

Caveolae represent a functional subtype of the so-called lipid-enriched microdomains wherein lipids dynamically interact with each other to form platforms important for signaling complexes and protein sorting [4,57]. All cavin members have been described to be located in caveolae although their first description in literature most of the time referred to soluble proteins with various functions operating in the cytosol. Their association in a cavin

complex and subsequently their caveolae recruitment can contribute to see them as protein adapters that would link signal transduction to the regulation of caveolae function.

Although no direct evidence was yet produced that cavins might influence signaling functions of caveolae platforms, such speculations arise first regarding the ability of cavin-2 and -3 to bind to PKC α and δ [20,21], respectively. Knowing that PKC α is a critical regulator of caveolae internalization [58] and that PKC inhibitors block caveolar endocytosis [59], cavins could compartmentalize PKC activity in caveolin-1-rich microdomains [30]. This PKC adapter function of cavin-3 may be responsible for EGFR targeting into caveolae. Indeed, EGFR localization in caveolae is markedly reduced following serine 654 PKC-dependent phosphorylation [60]. Moreover, *in vivo* data from models with cavin-1 deficiency in mice or humans provide clues that signaling pathways are affected [33,49]. Indeed, the level and activity of Glut4, the insulin receptor beta subunit and insulin-dependent Akt phosphorylation are markedly reduced in fat and muscle from Cavin-1-KO mice compared to their control littermates consistent with the overall insulin-resistant phenotype [33]. However, in patients with CAVIN1 mutations, an increase in Akt phosphorylation was observed in skeletal muscle possibly explaining the muscle hypertrophy developed by these patients. Surprisingly, an activation of myostatin signaling, known as a negative regulator of muscle growth, was also observed in Cavin-1-deficient skeletal muscles.

Although it appears that cavin-1 clearly influences caveolae-dependent signaling pathways, future studies will have to clarify the role of cavin-1 in muscular hypertrophy and related signaling pathways to understand the complexity of the observed disorders.

Finally, another function attributed to caveolae structures is their role as endocytic carriers for various ligands, toxins or viruses, reviewed in [61]. Overexpression of cavin-2 induced caveolin-1 positive tubules similar to those observed following B-subunit shiga toxin exposition in mice cells and model membranes [14,27]. Whereas this implicates a recruitment of Shiga toxin receptor Gb3 to caveolar domains and then favors an internalization of Shiga toxin via caveolar domains has to be examined. Together with the ability of cavin-3 to regulate caveolae-derived vesicles [14], cavin proteins might then also be able to regulate the endocytic potential of caveolae.

3.3. Cavins and further: towards the characteristics of the caveolar coat

The discovery of cavins as caveolae proteins opens new perspectives for the characterization of the caveolar coat. This rules out the paradigm that caveolins are the sole and only components of the caveolar coat. It's likely that other modules will be uncovered to bring us a better understanding of caveolae structures. Cavins have already revealed new features of these invaginations, the most surprising of which being their ability to form elongated caveolin-1 positive tubules [14]. Moreover, the presence of the cavin complex might serve as an adapter platform for mediating or regulating many signaling pathways.

However, many questions are still open and one of the next steps will be to determine the respective role of cavins and caveolins. Since cavins do not present the same pattern of expression depending on tissues, could caveolae present different molecular compositions in relation with diverse functions? Moreover, models of organisms like *Caenorhabditis elegans* and cells like leukocytes or neurons, which express caveolins but are unable to form caveolae invaginations, tend to prove that caveolins might play a role outside of caveolae [62]. The fact that caveolae formation requires cavin-1 and cavin-2 is moreover consistent with caveolae-independent functions of caveolins.

Cavin proteins, as new players in the caveolae field, are shedding a new light on these intriguing plasma membrane invaginations.

Future studies will have now to decrypt the individual role of each cavin in the caveolae coat complex as well as to characterize the assembly of the cavin complex and its implication in the regulation of the caveolae-dependent signaling pathways. Let's hope that such exciting studies will help to dissect the complexity of the caveolar structures and to reveal their full functionality.

Acknowledgments

NB is supported by the French Ministry for Research. Work in our laboratory is supported by INSERM and from the European Community's Seventh Framework Programme FP7/2007–2013 under grant agreement N°202272.

References

- [1] E. Yamada, The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1 (1955) 445–458.
- [2] G.E. Palade, Fine structure of blood capillaries. *J. Appl. Phys.* 24 (1953).
- [3] W. Schlörmann, F. Steiniger, W. Richter, R. Kaufmann, G. Hause, C. Lemke, M. Westermann, The shape of caveolae is omega-like after glutaraldehyde fixation and cup-like after cryofixation. *Histochem. Cell Biol.* 133 (2003) 223–228.
- [4] R.G. Parton, K. Simons, The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 185–194.
- [5] T.V. Kurzchalia, P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virta, M. Lehnert, K. Simons, VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell Biol.* 118 (1992) 1003–1014.
- [6] K.G. Rothberg, J.E. Heuser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, R.G. Anderson, Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68 (1992) 673–682.
- [7] A.M. Fra, E. Williamson, K. Simons, R.G. Parton, De novo formation of caveolae in lymphocytes by expression of VIP21-caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 8655–8659.
- [8] M.O. Parat, The biology of caveolae: achievements and perspectives. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 273 (2009) 117–162.
- [9] P.F. Pilch, R.P. Souto, L. Liu, M.P. Jedrychowski, E.A. Berg, C.E. Costello, S.P. Gygi, Cellular spelunking: exploring adipocyte caveolae. *J. Lipid Res.* 48 (2007) 2103–2111.
- [10] R. Chadda, S. Mayor, PTRF triggers a cave in. *Cell* 132 (2008) 23–24.
- [11] I.R. Nabi, Cavin fever: regulating caveolae. *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 789–791.
- [12] L. Liu, P.F. Pilch, A critical role of cavin (polymerase I and transcript release factor) in caveolae formation and organization. *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 4314–4322.
- [13] M.M. Hill, M. Bastiani, R. Luetterforst, M. Kirkham, A. Kirkham, S.J. Nixon, P. Walser, D. Abankwa, V.M. Oorschot, S. Martin, J.F. Hancock, R.G. Parton, PTRF-cavin, a conserved cytoplasmic protein required for caveola formation and function. *Cell* 132 (2008) 113–124.
- [14] C.G. Hansen, N.A. Bright, G. Howard, B.J. Nichols, SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae. *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 807–814.
- [15] K.A. McMahon, H. Zajicek, W.P. Li, M.J. Peyton, J.D. Minna, V.J. Hernandez, K. Luby-Phelps, R.G. Anderson, SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function. *EMBO J.* 28 (2009) 1001–1015.
- [16] M. Bastiani, L. Liu, M.M. Hill, M.P. Jedrychowski, S.J. Nixon, H.P. Lo, D. Abankwa, R. Luetterforst, M. Fernandez-Rojo, M.R. Breen, S.P. Gygi, J. Vinten, P.J. Walser, K.N. North, J.F. Hancock, P.F. Pilch, R.G. Parton, MURC/Cavin-4 and cavin family members form tissue-specific caveolar complexes. *J. Cell Biol.* 185 (2009) 1259–1273.
- [17] C.G. Hansen, B.J. Nichols, Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae. *Trends Cell Biol.*
- [18] N. Aboulaich, J.P. Vainonen, P. Stralfors, A.V. Vener, Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem. J.* 383 (2004) 237–248.
- [19] P. Jansa, S.W. Mason, U. Hoffmann-Rohrer, I. Grummt, Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *EMBO J.* 17 (1998) 2855–2864.
- [20] Y. Izumi, S. Hirai, Y. Tamai, A. Fujise-Matsuoka, Y. Nishimura, S. Ohno, A protein kinase Cdelta-binding protein SRBC whose expression is induced by serum starvation. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 7381–7389.
- [21] C. Mineo, Y.S. Ying, C. Chapline, S. Jaken, R.G. Anderson, Targeting of protein kinase Calpha to caveolae. *J. Cell Biol.* 141 (1998) 601–610.
- [22] T. Hasegawa, A. Takeuchi, O. Miyaishi, H. Xiao, J. Mao, K. Isobe, PTRF (polymerase I and transcript-release factor) is tissue-specific and interacts with the BFCOL1 (binding factor of a type-I collagen promoter) zinc-finger transcription factor which binds to the two mouse type-I collagen gene promoters. *Biochem. J.* 347 (Pt 1) (2000) 55–59.
- [23] P. Jansa, C. Burek, E.E. Sander, I. Grummt, The transcript release factor PTRF augments ribosomal gene transcription by facilitating reinitiation of RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) 423–429.
- [24] J. Vinten, A.H. Johnsen, P. Roepstorff, J. Harpoth, J. Tranum-Jensen, Identification of a major protein on the cytosolic face of caveolae. *Biochim. Biophys. Acta* 1717 (2005) 34–40.
- [25] A. Hayer, M. Stoeber, C. Bissig, A. Helenius, Biogenesis of caveolae: stepwise assembly of large caveolin and cavin complexes. *Traffic* (2009).
- [26] S.P. Wanaski, B.K. Ng, M. Glaser, Caveolin scaffolding region and the membrane binding region of SRC form lateral membrane domains. *Biochemistry* 42 (2003) 42–56.
- [27] W. Romer, L. Berland, V. Chambon, K. Gaus, B. Windschiegel, D. Tenza, M.R. Aly, V. Fraissier, J.C. Florent, D. Perrais, C. Lamaze, G. Raposo, C. Steinem, P. Sens, P. Bassereau, L. Johannes, Shiga toxin induces tubular membrane invaginations for its uptake into cells. *Nature* 450 (2007) 670–675.
- [28] J. Zimmerberg, M.M. Kozlov, How proteins produce cellular membrane curvature. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (2006) 9–19.
- [29] X.L. Xu, L.C. Wu, F. Du, A. Davis, M. Peyton, Y. Tomizawa, A. Maitra, G. Tomlinson, A.F. Gazdar, B.E. Weissman, A.M. Bowcock, R. Baer, J.D. Minna, Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers. *Dev. Cell* 61 (2001) 7943–7949.
- [30] K.A. McMahon, M. Zhu, S.W. Kwon, P. Liu, Y. Zhao, R.G. Anderson, Detergent-free caveolae proteome suggests an interaction with ER and mitochondria. *Proteomics* 6 (2006) 143–152.
- [31] T. Ogata, T. Ueyama, K. Isodono, M. Tagawa, N. Takehara, T. Kawashima, K. Harada, T. Takahashi, T. Shioi, H. Matsubara, H. Oh, MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein that modulates the Rho/ROCK pathway, induces cardiac dysfunction and conduction disturbance. *Physiol. Rev.* 28 (2008) 3424–3436.
- [32] M. Tagawa, T. Ueyama, T. Ogata, N. Takehara, N. Nakajima, K. Isodono, S. Asada, T. Takahashi, H. Matsubara, H. Oh, MURC, a muscle-restricted coiled-coil protein, is involved in the regulation of skeletal myogenesis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (2008) C490–C498.
- [33] L. Liu, D. Brown, M. McKee, N.K. Lebrasseur, D. Yang, K.H. Albrecht, K. Ravid, P.F. Pilch, Deletion of Cavin/PTRF causes global loss of caveolae, dyslipidemia, and glucose intolerance. *Cell Metab.* 8 (2008) 310–317.
- [34] L. Pelkmans, M. Zerial, Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature* 436 (2005) 128–133.
- [35] S. Gustincich, P. Vatta, S. Goruppi, M. Wolf, S. Saccone, G. Della Valle, M. Baggioni, C. Schneider, The human serum deprivation response gene (SDPR) maps to 2q32–q33 and codes for a phosphatidylserine-binding protein. *Genomics* 57 (1999) 120–129.
- [36] S. Le Lay, T.V. Kurzchalia, Getting rid of caveolins: phenotypes of caveolin-deficient animals. *Biochim. Biophys. Acta* (2005).
- [37] I. Mercier, J.F. Jasmin, S. Pavlides, C. Minetti, N. Flomenberg, R.G. Pestell, P.G. Frank, F. Sotgia, M.P. Lisanti, Clinical and translational implications of the caveolin gene family: lessons from mouse models and human genetic disorders. *Lab. Invest.* 89 (2009) 614–623.
- [38] A.W. Cohen, R. Hnasko, W. Schubert, M.P. Lisanti, Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol. Rev.* 84 (2004) 1341–1379.
- [39] Y. Hagiwara, T. Sasaoka, K. Araiishi, M. Imamura, H. Yorifuji, I. Nonaka, E. Ozawa, T. Kikuchi, Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice. *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000) 3047–3054.
- [40] F. Galbati, J.A. Engelman, D. Volonte, X.L. Zhang, C. Minetti, M. Li, H. Hou Jr., B. Kneitz, W. Edelmann, M.P. Lisanti, Caveolin-3 null mice show a loss of caveolae, changes in the microdomain distribution of the dystrophin–glycoprotein complex, and t-tubule abnormalities. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 21425–21433.
- [41] B. Razani, T.P. Combs, X.B. Wang, P.G. Frank, D.S. Park, R.G. Russell, M. Li, B. Tang, L.A. Jeliciks, P.E. Scherer, M.P. Lisanti, Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 8635–8647.
- [42] C. Minetti, F. Sotgia, C. Bruno, P. Sartezini, P. Broda, M. Bado, E. Masetti, M. Mazzocco, A. Egeo, M.A. Donati, D. Volonte, F. Galbati, G. Cordone, F.D. Bricarelli, M.P. Lisanti, F. Zara, Mutations in the caveolin-3 gene cause autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 18 (1998) 365–368.
- [43] E. Gazzzerro, F. Sotgia, C. Bruno, M.P. Lisanti, C. Minetti, Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 18 (2010) 137–145.
- [44] C.A. Kim, M. Delepine, E. Boutet, H. El Mourabit, S. Le Lay, M. Meier, M. Nemani, E. Bridel, C.C. Leite, D.R. Bertola, R.K. Semple, S. O'Rahilly, I. Dugail, J. Capeau, M. Lathrop, J. Magre, Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 1129–1134.
- [45] H. Cao, L. Alston, J. Ruschman, R.A. Hegele, Heterozygous CAV1 frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis.* 7 (2008) 3.
- [46] D.S. Park, S.E. Woodman, W. Schubert, A.W. Cohen, P.G. Frank, M. Chandra, J. Shirani, B. Razani, B. Tang, L.A. Jeliciks, S.M. Factor, L.M. Weiss, H.B. Tanowitz, M.P. Lisanti, Caveolin-1/3 double-knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. *Am. J. Pathol.* 160 (2002) 2207–2217.
- [47] P.G. Frank, S.E. Woodman, D.S. Park, M.P. Lisanti, Caveolin, caveolae, and endothelial cell function. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23 (2003) 1161–1168.
- [48] T. Murata, M.J. Lin, Y. Huang, J. Yu, P.M. Bauer, F.J. Giordano, W.C. Sessa, Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *J. Exp. Med.* 204 (2007) 2373–2382.
- [49] Y.K. Hayashi, C. Matsuda, M. Ogawa, K. Goto, K. Tominaga, S. Mitsuhashi, Y.E. Park, I. Nonaka, N. Hino-Fukuyo, K. Haginoya, H. Sugano, I. Nishino,

- Human PTRF mutations cause secondary deficiency of caveolins resulting in muscular dystrophy with generalized lipodystrophy. *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 2623–2633.
- [50] A. Garg, A.K. Agarwal, Lipodystrophies: disorders of adipose tissue biology. *Biochim. Biophys. Acta* 1791 (2009) 507–513.
- [51] Y. Ishikawa, K. Otsu, J. Oshikawa, Caveolin; different roles for insulin signal? *Cell Signal.* 17 (2005) 1175–1182.
- [52] M. Bluher, M.D. Michael, O.D. Peroni, K. Ueki, N. Carter, B.B. Kahn, C.R. Kahn, Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev. Cell* 3 (2002) 25–38.
- [53] S. Martin, R.G. Parton, Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16 (2005) 163–174.
- [54] S. Le Lay, E. Hajdouch, M.R. Lindsay, X. Le Liepvre, C. Thiele, P. Ferre, R.G. Parton, T. Kurzchalia, K. Simons, I. Dugail, Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic* 7 (2006) 549–561.
- [55] A. Pol, S. Martin, M.A. Fernandez, M. Ingelmo-Torres, C. Ferguson, C. Enrich, R.G. Parton, Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol. Biol. Cell* 16 (2005) 2091–2105.
- [56] C.M. Blouin, S. Le Lay, A. Eberl, H.C. Koefeler, I.C. Guerrero, C. Klein, X. Le Liepvre, F. Lasnier, O. Bourron, J.F. Gautier, P. Ferre, E. Hajdouch, I. Dugail, Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects. *J. Lipid Res.* (2009).
- [57] K. Simons, D. Toomre, Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1 (2000) 31–39.
- [58] E.J. Smart, Y.S. Ying, R.G. Anderson, Hormonal regulation of caveolae internalization. *J. Cell Biol.* 131 (1995) 929–938.
- [59] L. Pelkmans, J. Kartenbeck, A. Helenius, Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat. Cell Biol.* 3 (2001) 473–483.
- [60] C. Mineo, G.N. Gill, R.G. Anderson, Regulated migration of epidermal growth factor receptor from caveolae. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 30636–30643.
- [61] L. Pelkmans, A. Helenius, Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3 (2002) 311–320.
- [62] B.P. Head, P.A. Insel, Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol.* 17 (2007) 51–57.